



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



*Ministero dell'Istruzione
dell'Università e Ricerca*

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Molecolari e Biomolecolari

DOTTORATO DI RICERCA

in

“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”

XXIII CICLO, A.A. 2008/2009

SSD CHIM/09

***DERIVATI IBRIDI DELL'ACIDO IALURONICO PER
APPLICAZIONI BIOMEDICHE E FARMACEUTICHE***

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Filippo Calascibetta

Tutor:

Ch.mo Prof. Giovanna Pitarresi

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	pag 1
1.1. L'acido ialuronico.....	pag 3
1.1.1. <i>Acido ialuronico: proprietà chimico fisiche, biosintesi, degradazione e applicazioni.....</i>	pag 5
1.1.1.1. <u>Struttura chimica e proprietà chimico fisiche.....</u>	pag 5
1.1.1.2. <u>Presenza di HA nell'organismo in condizioni fisiologiche.....</u>	pag 7
a. CD44 e l'acido ialuronico.....	pag 10
1.1.1.3. <u>Degradazione di HA.....</u>	pag 15
1.1.1.4. <u>Usi terapeutici</u>	pag 16
1.1.1.5. <u>Estrazione o sintesi di HA.....</u>	pag 18
1.1.2. <i>Vari metodi chimici usati per la sintesi dei derivati dell'HA.....</i>	pag 19
1.1.2.1. <u>Modificazione del COOH.....</u>	Pag 23
a. Amidazione.....	pag 23
b. Condensazione di Ugi.....	pag 32
c. Esterificazione sul COOH.....	pag 33
1.1.2.2. <u>Modificazione dell'OH.....</u>	pag 36
a. Formazione di legami eteri.....	pag 36
b. Formazione dell'emiacetale usando glutaraldeide.....	pag 39
c. Esterificazione sull'OH.....	pag 40
d. Formazione del carbammato.....	pag 42
e. Ossidazione con sodio periodato.....	pag 44
1.1.2.3. <u>Modificazione del $-NHCOCH_3$.....</u>	pag 45
1.1.3. <i>Derivati dell'HA.....</i>	pag 46
1.1.3.1. <u>Idrogeli di HA per supplementazione.....</u>	pag 46
a. Reticolazione chimica diretta.....	Pag 46
b. Reticolazione chimica di HA funzionalizzato.....	pag 48
c. Reticolazione in situ di HA funzionalizzato.....	Pag 49
d. Foto reticolazione di HA funzionalizzato.....	Pag 50
e. Idrogeli fisici.....	pag 52
1.1.3.2. <u>Coniugati di HA per il rilascio di farmaci.....</u>	pag 52
a. Coniugati HA-farmaco.....	pag 52

b.	Coniugati di HA a sistemi carrier.....	pag 62
c.	Coniugati di HA (reticolati o modificati) come sistemi per il rilascio modificato di farmaci.....	pag 64
d.	Derivati di HA non covalenti	pag 67
1.1.3.3.	<u>Rivestimenti con HA</u>	pag 69
1.1.4.	<i>Metodi chimico-fisici per la caratterizzazione</i>	pag 70
1.1.4.1.	<u>Caratterizzazione della struttura</u>	pag 70
a.	Spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR).....	pag 70
b.	Spettroscopia infrarossa (IR).....	pag 74
c.	Quantificazione delle ammine primarie mediante saggio alla ninidrina.....	pag 75
1.1.4.2.	<u>Morfologia</u>	pag 76
a.	Microscopia.....	pag 76
b.	Dynamic light scattering.....	pag 77
1.1.4.3.	<u>Caratterizzazione fisica</u>	pag 77
a.	Misure di rigonfiamento.....	pag 77
b.	Test di compressione.....	pag 78
c.	Analisi termiche.....	pag 79
d.	Determinazione del peso molecolare.....	pag 80
e.	Misure reologiche.....	pag 81
1.2.	L'acido Polilattico.....	pag 83
1.3.	Ciclodestrine.....	pag 87
1.3.1.	<i>Struttura chimica e proprietà delle ciclodestrine</i> ...	pag 87
1.3.2.	<i>Capacità complessante delle ciclodestrine</i>	pag 94
1.3.3.	<i>Considerazioni tossicologiche</i>	pag 96
1.3.4.	<i>Applicazioni farmaceutiche delle ciclo destrine</i>	pag 98
2.	SCOPO DELLA TESI.....	pag 101
3.	RISULTATI E DISCUSSIONI.....	pag 107
3.1.	Idrogeli medicati non-fouling per il rivestimento di protesi in titanio.....	pag 107
3.1.1.	<i>Sintesi del derivato N-idrossisuccinimidico del PLA</i>	pag 107
3.1.2.	<i>Degradazione di HA ad alto peso molecolare</i>	pag 108
3.1.3.	<i>Sintesi del sale di tetrabutylammonio dell'HA</i>	pag 109
3.1.4.	<i>Sintesi e purificazione dei copolimeri HA-g-PLA</i> ...	pag 110

3.1.5. Sintesi e purificazione dei copolimeri PEG-g-HA-g-PLA.....	pag 112
3.1.6. Preparazione del gel, incorporazione del farmaco e caricamento del gel sulla protesi.....	pag 116
3.1.7. Risultati degli esperimenti di rilascio.....	pag 118
3.1.8. Rilasci dal gel contenente vancomicina.....	pag 118
3.1.9. Rilasci dal gel contenente tobramicina.....	pag 136
3.1.10. Rilasci dal gel contenente vancomicina e tobramicina.....	pag 140
3.1.11. Prove reologiche e di sterilizzazione.....	pag 150
3.1.12. Rilasci dal gel HA-g-PLA _(C) sterilizzato in autoclave.....	pag 152
3.1.13. Impianto di una protesi di titanio rivestita dal gel HA-g-PLA _(C)	pag 154
3.1.14. Conclusioni.....	pag 156
3.2. Sintesi e caratterizzazione di un nuovo derivato acido ialuronico – β ciclodestrina.....	pag 160
3.2.1. Sintesi e caratterizzazione del derivato butirraldeidico dell'acido ialuronico (forma acetale).....	pag 160
3.2.2. Sintesi e caratterizzazione del derivato etilendiamminico della betaciclodestrina (β CD-EDA).....	pag 165
3.2.3. Sintesi e caratterizzazione del derivato HA-but- β CD-EDA.....	pag 169
3.2.4. Conclusioni.....	pag 179
4. PARTE SPERIMENTALE.....	pag 181
4.1. Idrogeli medicati non fouling per il rivestimento di protesi in titanio.....	pag 181
4.1.1. Materiali.....	pag 181
4.1.2. Apparecchiature.....	pag 182
4.1.3. Sintesi dei copolimeri HA-g-PLA.....	pag 183
4.1.4. Sintesi dei copolimeri PEG-g-HA-g-PLA.....	pag 186
4.1.5. Formazione del gel.....	pag 188
4.1.6. Formazione della soluzione contenente il farmaco.	pag 189
4.1.7. Caricamento della soluzione contenente il farmaco nel gel.....	pag 189

4.1.8. <i>Caricamento sulla protesi del gel contenente il farmaco e studi di rilascio in vitro</i>	pag 190
4.2. Sintesi e caratterizzazione di un nuovo derivato acido ialuronico β -ciclodestrina.....	pag 191
4.2.1. <i>Materiali</i>	pag 191
4.2.2. <i>Apparecchiature</i>	pag 191
4.2.3. <i>Sintesi del derivato HA-but- βCD-EDA</i>	pag 192
4.2.3.1. <u><i>Sintesi del derivato butirraldeidico dell'acido ialuronico (forma acetaltica)</i></u>	pag 193
4.2.3.2. <u><i>Sintesi del derivato etilendiamminico della β-ciclodestrina (βCD-EDA)</i></u>	pag 194
4.2.3.3. <u><i>Sintesi del derivato betaciclodestrinico dell'HA (HA-but- βCD-EDA)</i></u>	pag 195
5. BIBLIOGRAFIA.....	pag 199

1. INTRODUZIONE

Con il termine “biomateriale” si definisce un materiale bioattivo concepito per interfacciarsi con sistemi biologici allo scopo di guidare la crescita cellulare o sostituire un qualsiasi tessuto, fluido o organo mimandone la funzione naturale. La medicina e la chirurgia fanno ricorso, in maniera crescente, a materiali estranei all’organismo al fine di porre rimedio, in via provvisoria o definitiva, al deficit di una funzione fisiologica. Tali materiali, denominati biomateriali proprio per la loro capacità di sostituire parzialmente o completamente le funzioni di un organismo vivente, devono possedere il requisito fondamentale della biocompatibilità, vale a dire non devono interagire in maniera dannosa con l’organismo. Naturalmente i biomateriali vengono usati non solo come dispositivi destinati ad essere impiantati nel corpo umano, ma anche come materiali che hanno un contatto extracorporeo con i tessuti oppure col sangue. In questa classificazione vengono compresi anche i sistemi che consentono un rilascio controllato dei farmaci. A monte di queste considerazioni ogni biomateriale deve sottostare a stringenti test riguardanti le interazioni con il tessuto o con materiale cellulare che possono dar luogo a processi degradativi nei materiali ed a reazioni di intolleranza o rigetto nell’organismo. Due sono le caratteristiche principali che vanno

considerate nella valutazione della biocompatibilità di un materiale:

- la resistenza del materiale ai processi di degradazione,
- gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti.

La biocompatibilità di un materiale non va intesa comunque solo in riferimento alla sua sicurezza biologica, ma è strettamente legata anche alle caratteristiche chimico-fisiche ed alle proprietà meccaniche del materiale e deve pertanto essere validata dalla progettazione fino alla produzione del biomateriale.

I materiali utilizzati per applicazioni biomediche possono essere suddivisi in due classi principali: naturali e sintetici. I primi sono generalmente di natura proteica (come ad esempio, il collagene o la fibrina) o polisaccaridica (come ad esempio l'acido ialuronico). Il vantaggio principale nell'utilizzo di materiali naturali sta nella loro natura amminoacidica o polisaccaridica che ne facilita il riconoscimento da parte delle cellule, poiché posseggono intrinsecamente i segnali biochimici per l'attivazione di determinate risposte cellulari. D'altro canto, però, questi materiali di origine naturale presentano alcuni inconvenienti, quali la composizione spesso variabile, la scarsa prestazione meccanica, il limitato tempo di permanenza (veloce degradazione o assorbimento) e, soprattutto nel caso di materiali di derivazione animale, problemi relativi

all'immunogenicità. I materiali sintetici (ad esempio l'acido polilattico o il poli-etilenglicole), invece, hanno dalla loro i bassi costi di produzione, l'ottima riproducibilità e alte prestazioni meccaniche. Il maggiore svantaggio è che tali materiali non vengono riconosciuti dalle cellule in maniera specifica e quindi, non sono in grado di guidare l'interazione cellula-materiale.

Alcuni polimeri presentano numerosi vantaggi rispetto ad altre classi di materiali in quanto risultano avere una maggiore biocompatibilità, la possibilità di essere modificati ampiamente nella loro struttura e nelle proprietà fisico-meccaniche, sono facilmente lavorabili anche in forme e strutture complesse, è possibile modificarne chimicamente o fisicamente la superficie, possono formare idrogel e simulare la matrice extracellulare permettendo l'immobilizzazione di cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Possono essere ricordati in questo contesto materiali ibridi costituiti da polimeri di origine naturale e sintetica che consentono di realizzare strutture dalle proprietà modulabili in funzione della specifica applicazione.

1.1. L'acido ialuronico

Il numero crescente di usi biomedici per l'acido ialuronico (HA), ha favorito lo sviluppo di una vasta gamma di derivati a base di HA con

proprietà migliorate o modulate. Oltre alla vasta letteratura disponibile, il sito web Glycoforum-Hyaluronan Today pubblica articoli sugli aspetti biologici di HA, le sue applicazioni e i derivati dell'HA (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>).

La storia della ricerca dell'acido ialuronico può essere paragonata all'immagine di un albero in cui ogni ramoscello cresce a partire da un ramo preesistente nato dalle esperienze accumulate nel tempo (Figura 1).

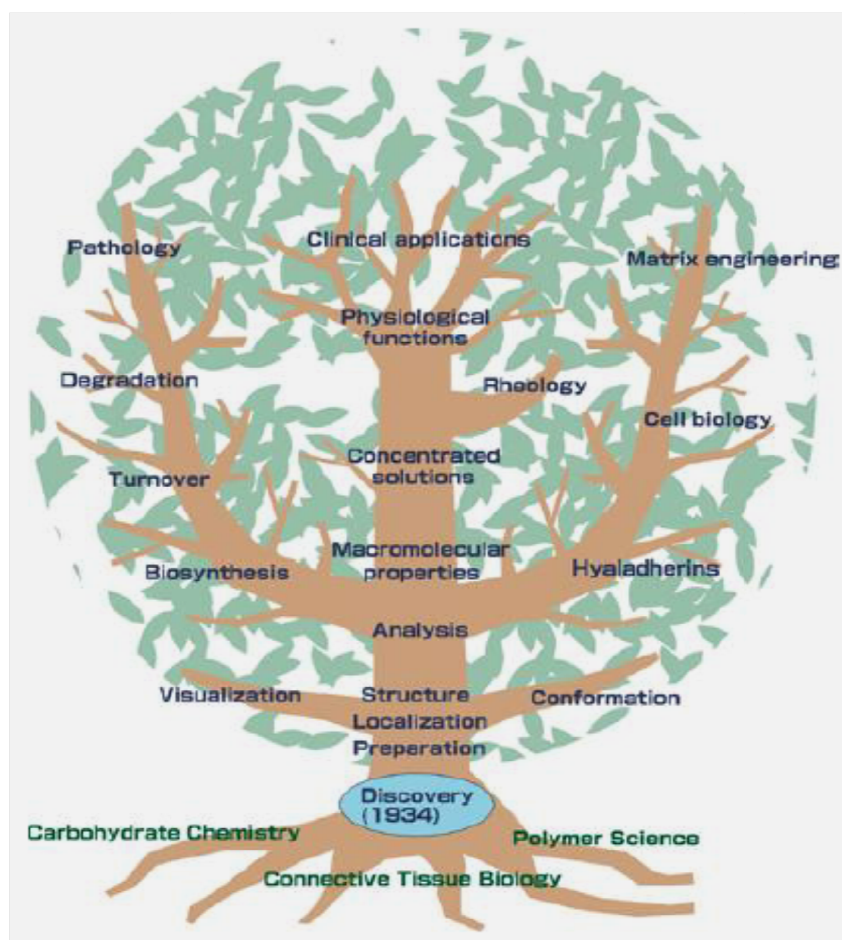


Figura 1 – Albero della ricerca dell'acido ialuronico

Le radici di questo albero sono ancorate principalmente alla chimica dei carboidrati, alla biologia dei tessuti connettivi e alla scienza dei polimeri. I carboidrati erano noti fin dalla fine dell'800 e già alcuni anni più tardi cominciarono le prime estrazioni di polisaccaridi da tessuti connettivi.

Il termine “acido ialuronico” risale al 1934 quando Karl Meyer e John Palmer, della Columbia University, descrissero un nuovo polisaccaride isolato dall'umor vitreo bovino contenente acidi uronici, pertanto coniarono il termine “hyaluronic acid” da *hyaloid* (vitreo) e *uronic acid*.

Inizialmente isolato come acido, in condizioni fisiologiche è presente come sale sodico. Bisognerà attendere il 1950 per conoscere esattamente la struttura di questo polisaccaride, quando Karl Meyer e i suoi collaboratori isolarono degli oligosaccaridi, ottenuti per attacco enzimatico all'acido ialuronico mediante ialuronidasi, studiandone così la struttura nel dettaglio.

1.1.1. Acido ialuronico: proprietà chimico fisiche, biosintesi, degradazione e applicazioni

1.1.1.1. Struttura chimica e proprietà chimico fisiche

HA è un polisaccaride lineare costituito da unità disaccaridiche ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil glucosammina unite da

legami glicosidici β (1,4) e β (1,3) (Figura 2). In condizioni fisiologiche forma un sale sodico, quindi carico negativamente (ialuronato di sodio), in queste condizioni, è altamente idrofilo, circondato da una sfera di molecole d'acqua legate tramite legami a idrogeno. Le proprietà chimico-fisiche di HA sono state oggetto di studi approfonditi (Day & Sheehan, 2001; Fouissac, Milas, Rinaudo, & Borsali, 1992; Lapčik, De Smedt, Demeester, & Chabreček, 1998; Laurent & Fraser, 1992).

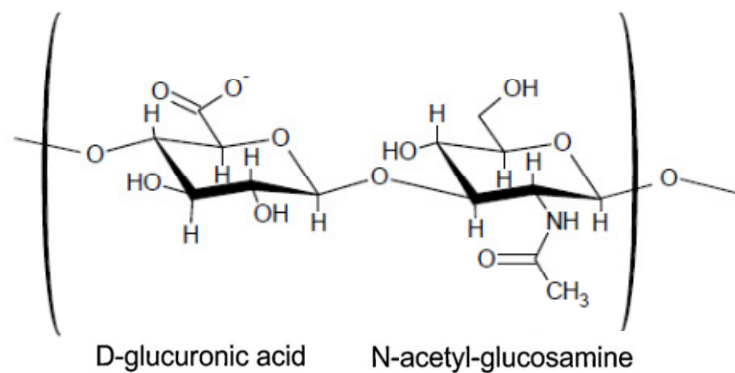


Figura 2 – Struttura chimica dell'HA

Il suo peso molecolare può raggiungere 8×10^6 Da, 10^7 Da o 10^8 Da secondo diversi autori, in funzione dell'enzima che catalizza la sua sintesi (Girish & Kemparaju, 2007; Kogan et al., 2007; Stern, Kogan, Jedrzejewski, & Soltes, 2007). A causa dell'elevato peso molecolare e delle forti interazioni intramolecolari, le soluzioni acquose di HA sono

altamente viscosi e presentano un tipico comportamento *shear thinning*.

Trattamenti in condizioni alcaline o acide provocano l'idrolisi delle catene di HA (Ghosh, Kobal, Zanette, & Reed, 1993; Maleki, Kjoniksen, & Nystrom, 2008). La degradazione in condizioni alcaline risulta essere più marcata e veloce rispetto a quella in condizioni acide.

HA in numerosi studi ha dimostrato anche di possedere proprietà *non-fouling* (Benjamin T. et al, 2008).

1.1.1.2. Presenza di HA nell'organismo in condizioni fisiologiche

HA è naturalmente presente negli organismi vertebrati, così come nei batteri. Esso è altamente presente nel corpo umano, nella matrice extracellulare (MEC) dei tessuti connettivi. È particolarmente abbondante nel liquido sinoviale del ginocchio, nel derma della pelle e nel corpo vitreo dell'occhio (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997; Laurent & Fraser, 1992; Robert, Robert, & Renard, 2010). In condizioni fisiologiche tutti i gruppi carbossilici dell'acido glucuronico sono completamente ionizzati conferendo alla molecola di acido ialuronico la capacità di coordinare molte molecole di acqua raggiungendo un elevato grado d'idratazione. Nella matrice amorfa di

un tessuto connettivo e in generale nella matrice extracellulare (ECM), l'acido ialuronico si occupa quindi di mantenerne il grado di idratazione, la turgidità, la plasticità e la viscosità trattenendo un notevole numero di molecole d'acqua. Questo polimero è anche in grado di agire come ammortizzatore di shock meccanici nonché come efficiente lubrificante (ad esempio nel liquido sinoviale) prevenendo il danneggiamento delle cellule del tessuto da stress fisici. L'alto peso molecolare dell'acido ialuronico insieme al suo alto grado di idratazione permette a più catene di organizzarsi a formare una struttura dinamica di tipo reticolare (Figura 3) con due funzioni principali:

- creare un'impalcatura molecolare con architettura interna nanoscopica per mantenere la forma ed il tono del tessuto,
- funzionare come *filtro* contro la diffusione libera nel tessuto di particolari sostanze, batteri, agenti infettanti.

Solamente le sostanze con peso molecolare abbastanza basso da poter passare attraverso le “maglie” di questo reticolo potranno diffondere liberamente nel tessuto; tutte le molecole e metaboliti, come anche batteri o virus, con dimensioni maggiori (qualche micron) saranno trattenuti nelle maglie del reticolo.

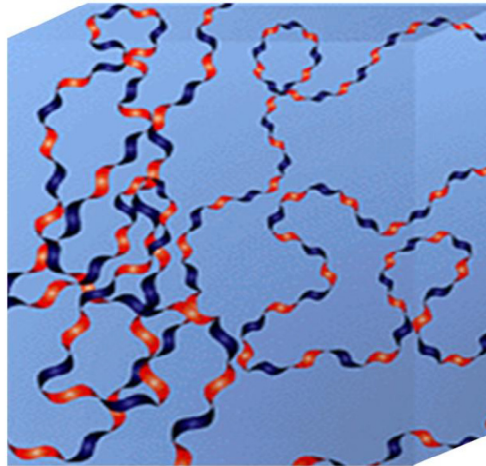


Figura 3 – “Nastro” di acido ialuronico in una struttura reticolare tridimensionale

Tuttavia bisogna notare che molti batteri sono dotati di ialuronidasi, enzima in grado di idrolizzare i legami $\beta(1-4)$ dell'acido ialuronico, permettendo loro di aprirsi un varco nella struttura 3D del polisaccaride.

È stato anche dimostrato e confermato che HA è coinvolto nelle attività intracellulari, che includono i processi di regolazione, migrazione e adesione cellulare (Laurent, Laurent, & Fraser, 1995; Lee & Spicer, 2000). L'alto peso molecolare conferisce a HA, tra le altre, delle proprietà anti-angiogeniche e anti-infiammatorie, al contrario frammenti di HA a basso peso molecolare provocano attività biologiche opposte, cioè infiammazione, immunostimolazione e angiogenesi (Stern, Asari, & Sugahara, 2006). HA ha dei siti specifici di legame su alcuni recettori quali CD44, RHAMM e ICAM-1 tutti

coinvolti in meccanismi cellulari come la riparazione cellulare, la proliferazione, la motilità e la regolazione della risposta infiammatoria (Weiss JM, 1998.; Tzircotis G, 2005.). Molti autori hanno riportato e rivisto le numerose funzioni di HA e dei suoi frammenti nei processi di riparo delle ferite (wound healing) (Chen & Abatangelo, 1999; Stern et al., 2006), come pure nella crescita tumorale e proliferazione del cancro, durante le quali i recettori CD44 sono overespressi (Stern, 2008; Sugahara et al., 2006; Zhang, Underhill, & Chen, 1995).

a. CD44 e l'acido ialuronico

Il CD44 è una proteina transmembrana di tipo 1, ha la funzione di principale molecola di adesione cellulare per l'acido ialuronico (HA) e di internalizzazione dello stesso (Nagano O. et al, 2004; Bajorath J. Et al 2000.) L'interazione tra acido ialuronico e CD44 influenza l'adesione ai componenti della matrice extracellulare ed è implicata nella stimolazione dell'aggregazione, proliferazione, migrazione cellulare e angiogenesi (Turley EA., et al, 1993.).

Tutte queste proprietà biologiche sono essenziali nell'attività fisiologica delle cellule normali ma in particolari condizioni sono associate ad attività patologiche ed inoltre possono essere messe in atto dalle cellule tumorali (Naor D., et al, 1997).

Il legame tra l'acido ialuronico e la molecola di adesione CD44 può dare inizio ad una serie di eventi che cominciano con modificazioni dell'aderenza alla matrice e proseguono con l'attivazione di altre molecole (quali fattori di crescita), degradazione della matrice stessa, angiogenesi, permeazione dei vasi, extravasazione (Aruffo A., et al 1990.). Tutti questi steps sono necessari nell'iniziazione della via metastatica (Marhaba R., et al 2004.; Agnantis NJ., et al 2004). Schematicamente si possono considerare 4 domini come costituenti il recettore: un dominio distale extracellulare, sede del legame con acido ialuronico; un dominio prossimale extracellulare, in cui si riscontrano variazioni per splicing alternativo; un dominio transmembrana, modulatore del legame col ligando; un dominio citoplasmatico, responsabile dell'interazione con le proteine del citoscheletro e dell'attivazione dei segnali intracellulari. Anche questa regione è interessata a splicing alternativo, per formare 2 varianti (Short tail o Long tail). Inoltre la porzione citoplasmatica del recettore sembra influenzare il legame con l'HA, ma una sua eventuale troncatura non ne preclude totalmente il legame. Si è visto infatti che i recettori tronchi hanno comunque capacità di legame verso alcuni anticorpi anti-CD44 (Lesley J., et al 1992) (Figura 4.).

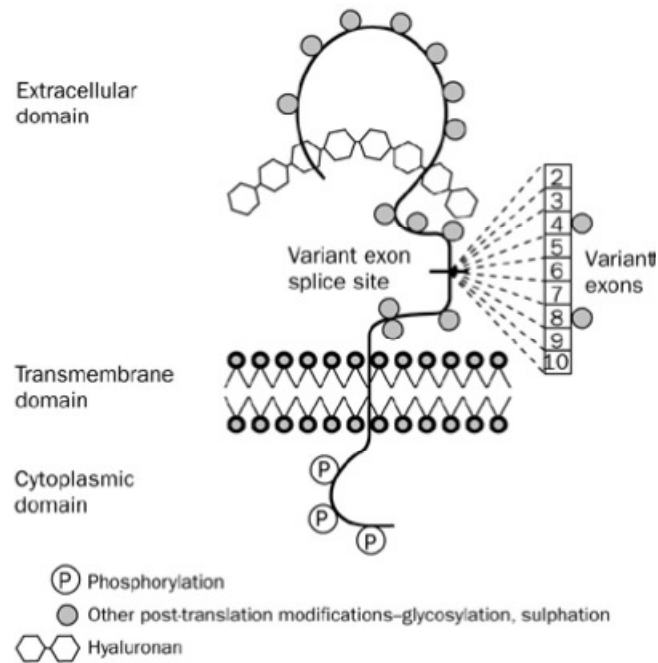


Figura 4 – Struttura schematica del recettore CD44

Il recettore CD44 non solo è il principale recettore per l'acido ialuronico espresso sulle cellule, ma è anche responsabile del suo ingresso nella cellula. Studi effettuati su macrofagi alveolari, condrociti umani e bovini e sulla linea isolata SV-3T3, utilizzando acido ialuronico marcato, hanno messo in luce un meccanismo vescicola mediato d'internalizzazione che è illustrato in figura 5 (Hua Q., et al 1993; Kaya G., et al 1997).

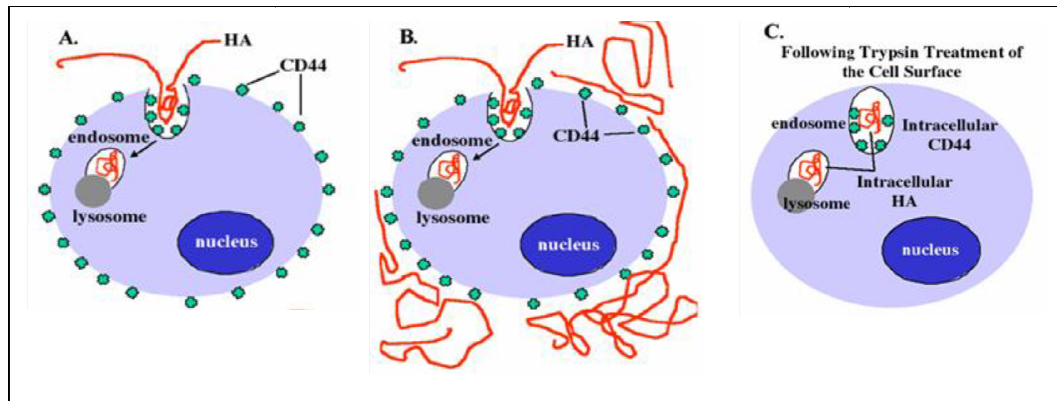


Figura 5 – Meccanismo proposto per l’internalizzazione di HA

Una volta all’interno della cellula, l’acido ialuronico viene degradato nell’endosoma così formato, ad opera di enzimi specifici, le ialuronidasi, che in situazione fisiologica non si ritrovano secrete nell’ambiente extracellulare. La struttura del recettore CD44, con un dominio extracitoplasmatico, un dominio transmembrana ed un dominio citoplasmatico, ricorda da vicino la struttura di molti trasduttori di segnale. Ma la coda citoplasmatica del recettore non possiede nessuna attività intrinseca, né come fosfatasi, né come tirosin chinasi. La trasduzione del segnale all’interno del citoplasma avviene per CD44 in maniera analoga al signaling delle integrine, ovvero, tramite la mediazione di proteine di segnale associate che si legano al dominio citoplasmatico di CD44.

In generale, le risposte evocate all’interno della cellula dal legame tra acido ialuronico e recettore CD44 sono molteplici, ma generalmente il

tipo di risposta è determinato dalle dimensioni della molecola di HA che lega il recettore.

Numerosi studi sono stati condotti per cercare di spiegare verosimilmente quali siano i motivi di una tale eterogenicità di effetti. La spiegazione più accreditata al momento sembra essere la capacità dell'acido ialuronico di legare contemporaneamente più recettori, formando dei veri e propri "cluster".

A seconda del numero di recettori "cristallizzati" dal legame con la molecola di acido ialuronico, non più liberi, cioè, di muoversi all'interno del mosaico fluido della membrana citoplasmatica in maniera indipendente, la risposta associata sarebbe differente, in dipendenza anche dal tipo di cellula che si prende in esame.

Un comportamento molto particolare è stato notato per oligomeri di HA (oHA), costituiti da un bassissimo numero di ripetizioni del dimero costituente HA (3-10 ripetizioni). Essi sono infatti in grado di inibire la proliferazione tumorale in vivo (Zeng C., et al 1998), inducono apoptosi (Ghatak S., et al 2002., Alaniz L., et al 2006), e reversiono la resistenza ai chemioterapici (Misra S., et al 2003;) a seguito del legame con il recettore CD44.

1.1.1.3. Degradazione di HA

È ben noto che l'emivita di HA dopo iniezione sottocutanea non supera le 24 ore (Brown, Laurent, & Fraser, 1991), poiché HA, dopo essere stato internalizzato in seguito a interazione con il recettore CD44 presente sulla superficie della membrana cellulare, è naturalmente degradato nell'organismo da un complesso meccanismo enzimatico che coinvolge l'enzima ialuronidasi (Hyal) (Aruffo, Stamenkovic, Melnick, Underhill & Seed, 1990; Girish & Kemparaju, 2007; Jedrzejewski & Stern, 2005). Si pensa che la degradazione di HA sia un processo altamente organizzato e strettamente controllato per generare dei frammenti di questo polisaccaride di dimensioni definite destinati a delle funzioni biologiche specifiche. Hyal-1 e Hyal-2 sono le ialuronidasi più espresse. Modelli molecolari hanno indicato che i siti d'interazione dell'enzima Hyal-2 e del recettore CD44 sono i gruppi carbossilici di HA (Banerji et al., 2007). HA può anche essere degradato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Lurie, Offer, Russo, Samuni, & Nitzan, 2003; Stern et al., 2007). Il meccanismo di degradazione differisce a seconda del tipo di ROS coinvolto ed è stato descritto in dettaglio da Stern e collaboratori (Stern et al., 2007).

1.1.1.4. Usi terapeutici

Le proprietà uniche di HA hanno portato al suo utilizzo per una vasta gamma di applicazioni mediche (Kogan et al., 2007). In primo luogo, HA è somministrato mediante iniezione per compensare la sua perdita come risultato dell'invecchiamento, di malattie o procedure chirurgiche. Usi clinici comprendono: in chirurgia e dermatologia estetica, per eliminare rughe e prevenire l'invecchiamento della pelle e per il riempimento dermico (Athre, 2007; Kablik, Monheit, Yu, Chang, & Gershkovich, 2009). HA viene utilizzato per il trattamento di infiammazioni e malattie degenerative articolari che comportano la degradazione di HA e quindi la diminuzione della viscosità del liquido sinoviale all'interno delle giunture. Tale trattamento prevede delle iniezioni locali che hanno lo scopo di reintegrare i fluidi sinoviali che riempiono le giunzioni osteoarticolari (Adams M. E., et al 1995). Inoltre HA viene usato in seguito a procedure chirurgiche oftalmiche sul corpo vitreo dell'occhio o come principale costituente nella produzione di lacrime artificiali (Balazs, 2008). Per qualsiasi applicazione venga impiegato questo polisaccaride ha il vantaggio di essere biocompatibile e sicuro, e di indurre minimi effetti da reazione da corpo estraneo. Grazie al suo importante ruolo fisiologico nella riparazione dei tessuti, come indicato sopra, HA viene impiegato

anche per la guarigione delle ferite (King, Hickerson, Proctor & Newsome, 1991; Lin, Matsumoto, Kuroyanagi & Kagawa, 2009).

Hyalofill®, Hyalogran®, and Ialuset® sono esempi di medicazioni o bendaggi impregnati con soluzioni di HA.

Entrambi HA e ialuronidasi sono stati usati come marcatori tumorali per differenti tipi di cancro, grazie al loro ruolo nella crescita tumorale e proliferazione (Auvinen et al., 2000; Franzmann et al., 2003). Oggi l'HA è anche studiato per il suo impiego nei sistemi di rilascio. Il processo di internalizzazione che lo coinvolge da parte delle cellule attraverso il recettore CD44 durante la sua degradazione enzimatica consente il rilascio di farmaci coniugati ad esso o intrappolati nelle particelle di HA (Esposito, Menegatti, & Cortesi, 2005; Peer & Margalit, 2004a; Platt & Szoka, 2008). Tali sistemi hanno dimostrato un considerevole miglioramento della solubilità, dell'assorbimento e/o dell'efficacia del farmaco (Drobnik, 1991; Larsen & Balazs, 1991; Oh et al., 2010; Vercruysse et al., 1998) e sono stati specificatamente studiati anche per farmaci antitumorali diretti contro tumori che sovra esprimono il recettore CD44 (Hua, Knudson, & Knudson, 1993; Platt & Szoka, 2008).

1.1.1.5. Estrazione o sintesi di HA

HA inizialmente è stato isolato dall'umor vitreo bovino e dopo dalla cresta del gallo (Shiedlin et al., 2004) e dal cordone ombelicale umano. I progressi nelle biotecnologie hanno portato allo sviluppo di batteri geneticamente modificati che producono grandi quantità di HA e oggi la maggior parte dei prodotti presenti in commercio sono derivati dal batterio *Streptococcus equi* (Restylane®, Juvederm®, ecc.), in questo modo è stato possibile ridurre il rischio di contaminazione da agenti patogeni animali. Gli sforzi da allora si sono concentrati sulla produzione di HA dai batteri cercando di migliorare il rendimento, con metodi meno costosi e con tecniche di purificazione efficace (Rangaswamy & Jain, 2008). L'attenzione della ricerca si è anche rivolta alla preparazione di frammenti di HA con specifiche e uniformi dimensioni, controllando la degradazione di HA ad alto peso molecolare, usando varie tecniche che includono la degradazione acida, alcalina, con ultrasuoni e termica. Queste tecniche sono state tutte descritte in dettaglio (Stern et al., 2007). Un altro approccio per ottenere frammenti oligosaccaridici di HA di dimensioni definite prevede una sintesi chemio enzimatica (DeAngelis, 2008). Questo metodo ha portato alla commercializzazione di oligomeri di HA monodispersi con il nome di

Select-HATM (Hyalose LLC) con basso valore di indice di polidispersità.

1.1.2. Vari metodi chimici usati per la sintesi dei derivati dell'HA

HA può essere chimicamente modificato in due diversi modi: per coniugazione o per reticolazione. Tutte e due le metodiche sono basate sulla stessa reazione chimica, la differenza è che nel primo caso il composto è legato (graft) su una catena di HA da un singolo legame, mentre nel secondo caso le differenti catene di HA sono legate insieme da due o più legami come descritto in figura 6. Esistono poi differenti procedure di reticolazione: la reticolazione diretta, la reticolazione di derivati di HA e la reticolazione di differenti derivati di HA.

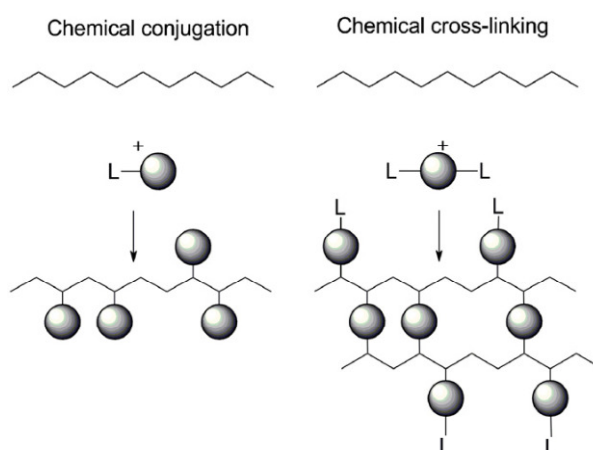


Figura 6 – Coniugazione chimica e reticolazione chimica di un polimero

La modificazione chimica di HA può essere effettuata su due siti funzionali disponibili: il gruppo carbossilico e il gruppo idrossilico (Figura 1). Un gruppo amminico può anche essere recuperato tramite deacetilazione del gruppo N-acetilico. Non è noto quale dei gruppi idrossilici reagisce, anche se è ragionevole presumere che la reazione avviene principalmente sull'idrossile del carbonio sei della porzione N-acetilglucosaminica di HA a causa della migliore accessibilità dei reagenti agli alcoli primari. Numerosi metodi sono stati riportati per effettuare la reticolazione o la coniugazione su HA. Alcuni metodi usano come solvente di reazione l'acqua mentre altri, dato che usano reagenti sensibili all'idrolisi, devono essere eseguite in solventi organici, quali dimetilformammide (DMF) o dimetilsolfossido (DMSO). In questo caso, HA sale sodico iniziale deve prima essere convertito nella sua forma acida o nel sale di tetrabutylammonio (TBA) per renderlo solubile in solventi organici.

Questa procedura richiede uno step addizionale, che aumenta la probabilità di frammentazione delle catene di HA dovuta ai trattamenti chimici e fisici necessari per la formazione del sale di tetrabutylammonio (Bergman, Elvingson, Hilborn, Svensk, & Bowden, 2007; Pelletier, Hubert, Lapique, Payan & Dellacherie, 2000). Poiché HA è solubile in acqua, il modo più semplice per eseguire la reazione

è in acqua. Tuttavia, in ambiente acquoso, alcune reazioni sono pH-dipendenti e devono essere eseguite in condizioni acide o alcaline, le quali hanno dimostrato indurre significativa idrolisi delle catene di HA (Maleki et al., 2008).

Questi aspetti hanno spinto i gruppi di ricerca ad esplorare nuove vie sintetiche per lo sviluppo dei derivati di HA con adeguate caratteristiche in base alle loro specifiche esigenze. In alcuni casi, l'efficacia della reazione non è un criterio, perché un basso grado di sostituzione o di reticolazione sono sufficienti per l'effetto desiderato (Yeom et al., 2010), mentre per altre applicazioni, sono richiesti alti gradi di sostituzione (Schneider et al., 2007).

Il paragrafo successivo riporta le differenti tecniche chimiche descritte in letteratura per la modificazione dei tre siti target dell'HA. La tabella 1 riassume tutte le tecniche di modificazione chimica che verranno descritte.

Tabella 1 – Modificazioni chimiche dell'HA

HA target site	Reaction type	Activator	Reagents	Solvent	References
-COOH	Amidation	Carbodiimides	EDC, NHS	Water (pH 4.75–7.5) or DMSO	Danilshesky and Siskovic (1971), Vercautse et al. (1998), Prestwich et al. (1998), Bulpitt and Aeschlimann (1999), Oh et al. (2010), Poyani and Prestwich (1994a), Bulpitt and Aeschlimann (1999) and Schneider et al. (2007)
	CMPI	CMPI,	triethylamine	DMF or DMSO	Magnani et al. (2000), Della Valle (1994), Young et al. (2004) and Della Valle and Romeo (1989)
		CDMT	CDMT, NMM	Water/acetonitrile	Bergman et al. (2007)
		1,1'-Carbonyl-diimidazole	1,1'-Carbonyl-diimidazole	DMSO	Bellini and Toppai (2000) and Borzacchiello et al. (2010)
	Ugi condensation		Formaldehyde, diamine, cyclohexyl isocyanide	Water (pH 3)	De Nooy et al. (2000), Crescenzi et al. (2003a, 2003b) and Maleki et al. (2007)
	Esterification	Diazomethane	Trimethylsilyl diazomethane, acetic acid	DMSO	Jeanloz and Forchielli (1950) and Hirano et al. (2005)
		Alkyl halides	Alkyl iodides or bromides	DMSO	Della Valle and Romeo (1986) and Pelleier et al. (2000)
		Tetraethylene glycol tosylate	Tetraethylene glycol	DMSO	Huin-Amargier et al. (2006)
		Bisepoxides	Butanediol-diglycidyl ether	Water (acetic acid, pH 2–5)	De Belder and Malson (1986) and Tomihata and Ikada (1997a)
	Oxidation	Sodium periodate	Sodium periodate	Water	Jia et al. (2004) and Glass et al. (1996)
-OH	Ether formation	Bisepoxides	1,2,3,4-Diepoxybutane Butanediol-diglycidyl ether	Water (0.25M NaOH, pH>13) Water (0.2M NaOH, pH>13)	Laurent et al. (1964) Malson and Lindqvist (1986) and Piron and Tholin (2002)
			Ethylene glycol diglycidyl ether and polyglycerol	Water (1M NaOH, pH 14)	Yui et al. (1992)
			Epichlorohydrin or diepoxyoctane	Water (pH 10 then pH 4)	Zhao (2000)
		Divinyl sulfone	Divinyl sulfone	Water (0.2M NaOH, pH> 13)	Balazs and Leshchiner (1968), Collins and Birkinshaw (2007), Ramamurthi and Vesely (2002) and Eun et al. (2008)
		Ethylensulfide	Ethylensulfide,	Water (pH 8.5–10)	Serban et al. (2008)
	Hemiacetal	Glutaraldehyde	Glutaraldehyde	Water (pH 2)	Tomihata and Ikada (1997b), Crescenzi et al. (2003a, 2003b) and Collins and Birkinshaw (2007)
	Esterification	Alkyl succinic anhydrides	Octenyl succinic anhydride	Water (pH 9)	Tremmearas and Eenschooten (2007) and Eenschooten et al. (2010)
		Acyl-chloride activated carboxylate		DMSO	Pravata et al. (2008)
		Methacrylic anhydride		Water (pH 8–10)	Seidlits et al. (2010)
	Carbamate formation	Cyanogen bromide (CNBr)		Water (pH 9–10)	M'cochova et al. (2006) and Chytil and Pekař (2009)
-NHCOCH ₃	Deacetylation / amidation	Hydrazine sulfate		Water followed by DMSO	Bulpitt and Aeschlimann (1999), Bellini and Toppai (2000), Dahl et al. (1988), Crescenzi et al. (2002) and Oerther et al. (2000)

1.1.2.1. Modificazione del –COOH

a. Amidazione

Amidazione con carbodiimidi

L'amidazione in acqua con carbodiimidi è uno dei metodi più frequentemente usati per la modificazione di HA (Bulpitt & Aeschlimann, 1999; Oh et al., 2010; Prestwich, Marecak, Marecek, Vercruysse, & Ziebell, 1998; Vercruysse et al., 1998). Le carbodiimidi usate maggiormente sono 1-etil-3-[3-(dimetilammino)-propil]-carbodiimmide (EDC) per la sua solubilità in acqua. Danishefsky e Siskovic (1971) furono i primi a convertire i gruppi carbossilici di polisaccaridi incluso HA in ammidi. La presenza di legami ammidici fu rilevato tramite analisi infrarossa, cromatografia e titolazione elettrometrica, ed è stato calcolato un grado di sostituzione del 3,86%. Il meccanismo di reazione è stato studiato in dettaglio (Nakajima & Ikada, 1995). Il primo step della reazione di amidazione inizia con l'attivazione tramite EDC dell'acido carbossilico di HA, il quale forma un intermedio O-acil isourea. Il secondo step della reazione è l'attacco nucleofilo dell'ammina sull'HA attivato, il quale porta alla formazione di un legame amidico (Figura 7a). Tuttavia, l'intermedio O-acil isourea è altamente reattivo e reagisce anche con l'acqua, in tal caso si riorganizza rapidamente in un sottoprodotto stabile l'N-acil

urea, evitando così ulteriori reazioni con l'ammina. La reazione è molto delicata in quanto è fortemente dipendente dal pH e il pH ottimale per entrambe le fasi è diverso. Infatti, l'attivazione dell'acido carbossilico tramite EDC è più efficace se eseguita in ambiente acido (pH 3,5–4,5) (Nakajima&Ikada, 1995), mentre la formazione dell'ammido procede in maniera ottimale ad alti valori di pH, quando l'ammina è deprotonata. A valori di pH così alti, EDC è più rapidamente idrolizzata nel sottoprodotto N-acil urea e il processo di amidazione è impedito. Il compromesso non è quindi facile da mettere a punto, quindi ammine con alti valori di pKa non sono facilmente coniugabili ad HA utilizzando questo metodo. Anche se la maggior parte degli autori hanno mostrato un evidente processo di ammidazione (Danishefsky & Siskovic, 1971; Follain, Montanari, Jeacomine, Gambarelli, & Vignon, 2008; Nakajima & Ikada, 1995), Kuo, Swann, e Prestwich (1991) contraddicono tutta la precedente letteratura dimostrando che nessun legame ammidico si forma tra i gruppi acidi carbossilici di HA e i gruppi amminici. Usando lo stesso pH 4,75 come i precedenti autori fu ottenuto solo il sottoprodotto N-acilurea. Infatti, a questo valore di pH, l'ammina protonata non è così nucleofila e non reagisce facilmente con l'HA attivato. Sulla base di questi risultati, Kuo et al. ha proposto di utilizzare le carbodiimidi non

come attivatori, ma come reagente. In questo modo le bis-carbodiimidi sono state impiegate per reticolare l'HA e formare un gel reticolato con bis (N-acilurea) (Figura 7b). La sostituzione delle diammine tramite diidrazidi, le quali hanno valori molto più bassi di pK_a di 2-3, ha permesso di ottenere un maggiore grado di sostituzione, fino al 56% (Pouyani & Prestwich, 1994a). Con l'aggiunta di un grande eccesso di diidrazide adipica (ADH), non è stato osservato nessuna reticolazione, ma solo singole funzionalizzazioni e la formazione di legami diidrazidici (Figura 7c). Al fine di prevenire la formazione del sottoprodotto irreversibile N-acilurea, Bulpitt e Aeschlimann (1999) hanno proposto l'uso di N-idrossisuccinimide (NHS) o 1-idrossibenzotriazolo (HOBt) con EDC per fornire al materiale più resistenza all'idrolisi ed evitare la formazione di intermedi non riarrangiabili. NHS o HOBt reagiscono con l'O-acil isourea e il risultante intermedio attivato di HA subisce l'attacco nucleofilo dell'ammina. I meccanismi sono mostrati in Figura 7d. Esteri di HOBt hanno portato a un maggior grado di sostituzione di esteri di NHS, suggerendo maggiore reattività verso l'ammina. L'amidazione tramite l'utilizzo di EDC ha il vantaggio di poter essere eseguita in acqua partendo dal sale sodico di HA, senza precedenti manipolazioni. Inoltre, questo metodo non porta a degradazione della

catena di HA, secondo gli autori citati sopra e mantiene alto il peso molecolare dell'HA conservando le preziose proprietà viscoelastiche. Tuttavia, i reagenti devono essere aggiunti in grandi quantità perché l'idrolisi dell'EDC non può essere evitata e al range di pH richiesto dalla reazione la gran parte dell'ammina risulta protonata. Alcuni autori hanno effettuato la stessa reazione di amidazione ma sostituendo l'acqua con il DMSO (Bulpitt & Aeschlimann, 1999; Schneider et al., 2007). In questo modo il grado di sostituzione ottenuto è aumentato fino al 60-80%, suggerendo una riduzione dell'effetto d'idrolisi dell'EDC. Ovviamente in questo caso l'HA deve prima essere convertito dalla sua forma nativa di sale sodico nella sua forma acida per essere solubile in solvente organico.

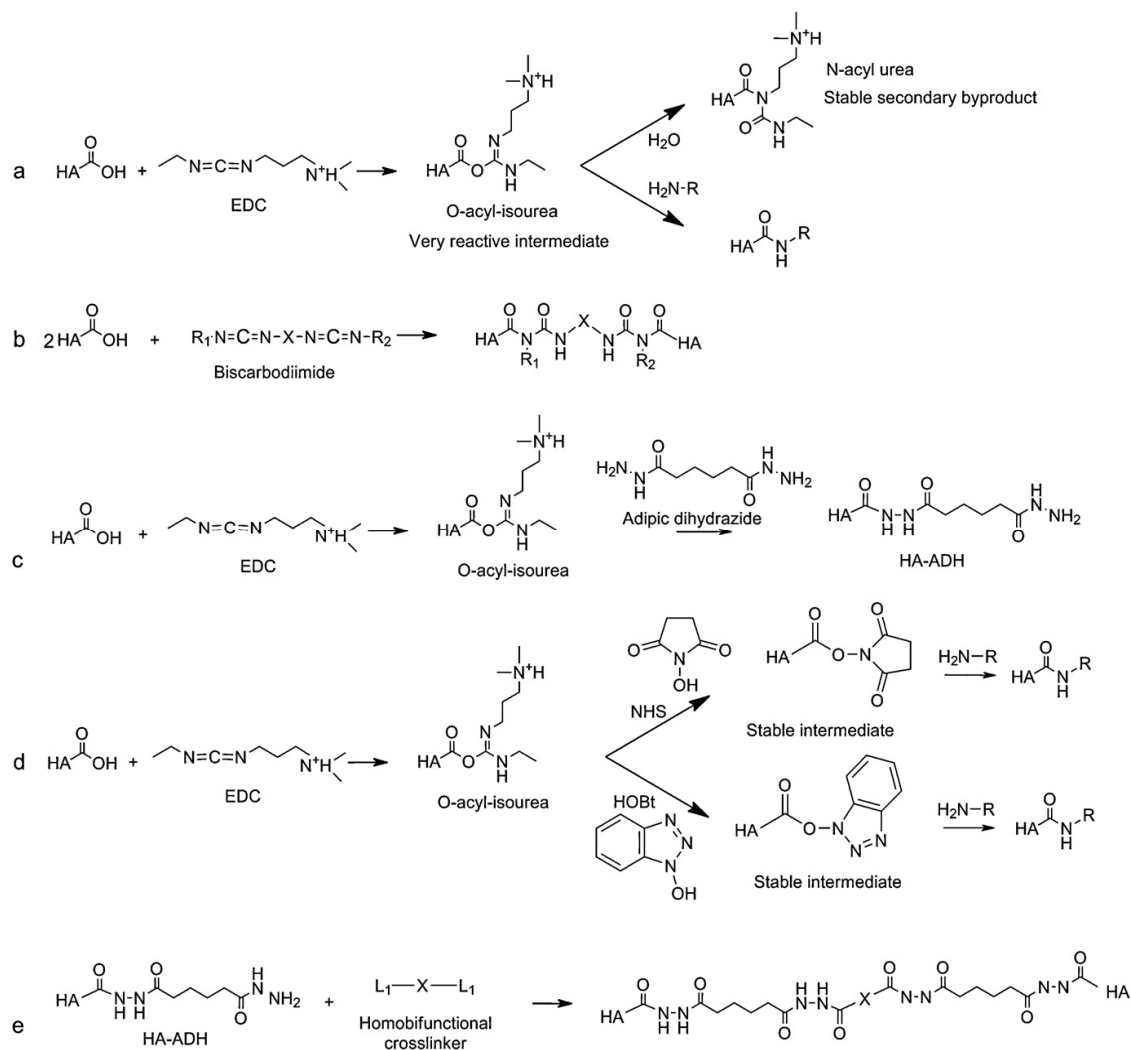


Figura 7 – Meccanismi di ammidazione di HA con EDC (Nakajima & Ikada, 1995) (a), reticolazione di HA con biscarbodiimmidi (Kuo et al., 1991) (b), amidazione di HA con EDC e diidrazide adipica (Pouyani & Prestwich, 1994a) (c), con EDC/NHS e EDC/HOBt (Bulpitt & Aeschlimann, 1999) (d), reticolazione di HA con un reticolante omobifunzionale (Bulpitt & Aeschlimann, 1999) (e).

Amidazione con 2-cloro-1-metilpiridinio ioduro (CMPI)

Magnani, Rappuoli, Lamponi e Barbucci (2000) hanno descritto una reazione di amidazione usando il 2-cloro-1-metilpiridinioioduro (CMPI) come agente attivante dei gruppi carbossilici di HA. Questa reazione è effettuata in un solvente organico anidro, la dimetilformammide (DMF), per minimizzare l'idrolisi del CMPI. Il sale sodico di HA deve prima essere convertito nel sale di tetrabutylammonio (TBA) per permettere la solubilizzazione in solvente organico. 1,3 Diaminopropano è stato usato per reticolare le catene di HA. In una prima fase il CMPI reagisce con il gruppo carbossilico di HA, formando un intermedio piridinico e rilasciando uno ione cloruro, neutralizzato dal tetrabutylammonio. La diammina nucleofila poi attacca il carbossile attivo dell'HA formando il legame ammidico (Figura 8a). La trietilammina neutralizza lo ione ioduro rilasciato. Lo svantaggio di questo metodo è la necessità di essere effettuato in solvente organico, motivo per cui è richiesto un lungo processo di purificazione e uno step preparativo aggiuntivo per convertire il sale sodico dell'HA nel suo sale di TBA.

Studi con il ^{13}C NMR hanno mostrato che il grado di reticolazione calcolato è vicino al valore teorico, suggerendo che il 100% del CMPI reagisce con i corrispondenti siti degli acidi carbossilici. Questo

metodo è inoltre altamente efficace infatti viene usata una quantità minore di reagente comparata ai precedenti metodi con carbodiimmidi. Quando non viene aggiunta l'ammina al mezzo di reazione, possono avvenire esterificazioni tra l'HA attivato dal CMPI con i suoi stessi gruppi ossidrilici dando così origine a legami crociati tra le molecole di HA (sia intra che intercatena) (Figura 8b).

Young, Cheng, Tsou, Liu e Wang (2004) hanno dimostrato che un idrogel di HA reticolato in questo modo è molto più rigido e resistente alla degradazione enzimatica in vitro quando si usa CMPI piuttosto che quando si usa EDC, confermando l'alta reattività del CMPI.

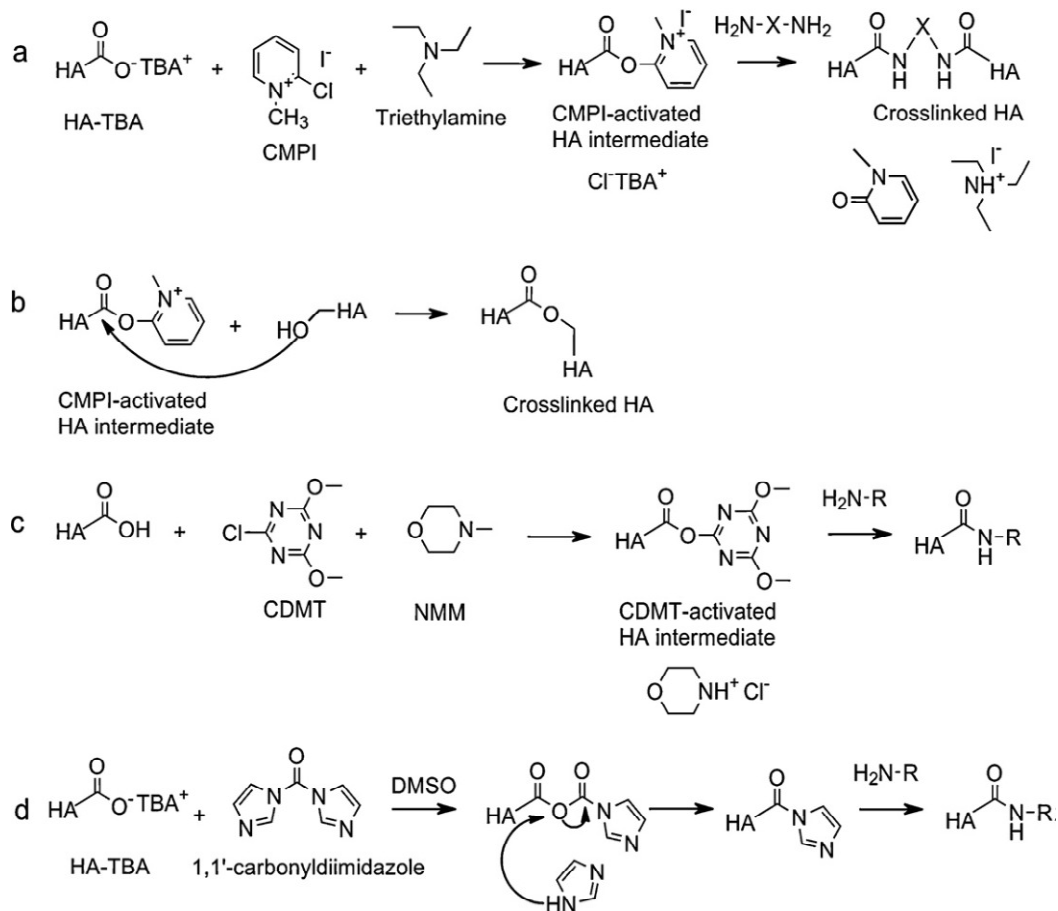


Figura 8 – Reazione di reticolazione di HA con ammine usando CMPI (Magnani et al., 2000) (a), usando solo CMPI (Della Valle, 1994) (b), amidazione usando CDMT (Bergman et al., 2007) (c), con carbonildiimidazolo (Bellini & Topai, 2000) (d)

Amidazione con 2-cloro-dimetossi-1,3,5-triazina (CDMT)

Bergman et al. (2007) hanno recentemente descritto un nuovo metodo per l'amidazione di HA usando la 2-cloro-dimetossi-1,3,5-triazina (CDMT) come agente attivante dei gruppi carbossilici. La reazione viene effettuata in una miscela di solventi con acqua e acetonitrile (3:2) per una solubilizzazione ottimale dei reagenti. Per questa reazione di amidazione in miscela con acqua non sono necessari

intermedi. L'N-metilmorfolino (NMM) è aggiunto alla miscela per neutralizzare gli ioni cloruro che si formeranno. L'intermedio HA attivato con CDMT poi reagisce con l'ammina per formare il legame amidico (Figura 8c). In questo modo sono stati ottenuti gradi di sostituzione fino al 25%, usando un rapporto di HA:CDMT pari a 2:1 e gli autori suggeriscono che gradi di sostituzione più alti possono essere ottenuti aumentando la quantità di CDMT. Questo è un metodo promettente per ottenere un'alta resa di grafting effettuando la reazione in miscele acquose di solventi e in condizioni blande.

Amidazione con carbonildiimidazolo

L'amidazione di HA utilizzando l'1,1-carbonildiimidazolo come agente attivante dei gruppi carbossilici dell'HA è stato brevettato da Fidia (Bellini & Topai, 2000). Questa reazione è effettuata in DMSO partendo dal sale HA-TBA. Il carbonildiimidazolo reagisce con HA per formare un intermedio altamente reattivo il quale si riarrangia rapidamente in un intermedio HA-imidazolo più stabile. Quest'ultimo poi reagisce con un'ammina per formare il legame amidico (Figura 8d). La procedura descritta è lunga comparata ai precedenti metodi, che usualmente sono effettuati durante la notte, perchè la formazione dell'intermedio imidazolo richiede 12 ore, seguita poi dalla reazione

di amidazione che prosegue per 48 ore. Tuttavia, la reazione non rilascia un acido forte ma solo CO₂ e imidazolo, che non sono composti tossici.

b. Condensazione di Ugi

Diversi autori hanno descritto la condensazione di Ugi per la reticolazione di HA (Crescenzi, Francescangeli, Capitani, et al., 2003; Crescenzi, Francescangeli, Taglienti, Capitani, & Mannina, 2003; De Nooy, Capitani, Masci, & Crescenzi, 2000; Maleki, Kjoniksen, & Nystrom, 2007). Il metodo prevede l'uso di una diammina come agente reticolante per formare un legame diamminico tra le catene del polisaccaride. La reazione è effettuata in acqua a pH 3 con formaldeide, cicloesil isocianato e la diammina. Nel primo step la diammina condensa con la formaldeide per formare una diimmina protonata la quale poi reagisce con il cicloesil isocianato. Il gruppo carbossilico di HA poi elimina l'intermedio cianurico attivato per formare il legame ammidico (acilammino) (Figura 9a). L'uso di formaldeide, la quale è risaputa essere cancerogena, richiede però specifiche procedure di manipolazione. Tuttavia questo metodo porta alla formazione di un'ammide secondaria, aggiungendo un secondo gruppo pendente, in questo caso un ciclo esile.

c. Esterificazione sul COOH

Formazione di legami esterei usando alogenuri alchilici

Della Valle e Romeo (1986) hanno brevettato l'esterificazione per mezzo dell'alchilazione dei gruppi carbossilici di HA usando alogenuri alchilici, come l'alchil ioduro o bromuro (Figura 9b). La reazione è stata effettuata per oltre 12 ore a 30°C. Pelletier et al. (2000) hanno sintetizzato un estere anfifilico di HA usando lo stesso metodo con bromuri alchilici, effettuando la reazione per oltre 24 ore. La reazione è stata effettuata in DMSO, il che comporta la conversione dell'HA sale sodico di partenza con il suo sale di TBA.

Formazione di legami esterei sfruttando l'attivazione mediante tosilati

Un altro esempio della stessa chimica di esterificazione è effettuato usando il tosilato come gruppo uscente, come descritto da Huin-Amargier, Marchal, Payan, Netter, e Dellacherie (2006). La reticolazione di HA è stata effettuata tramite esterificazione usando il tetraetileneglicole funzionalizzato con due gruppi tosilato (Figura 9c). La reazione è effettuata in DMSO partendo dal sale di TBA dell'HA.

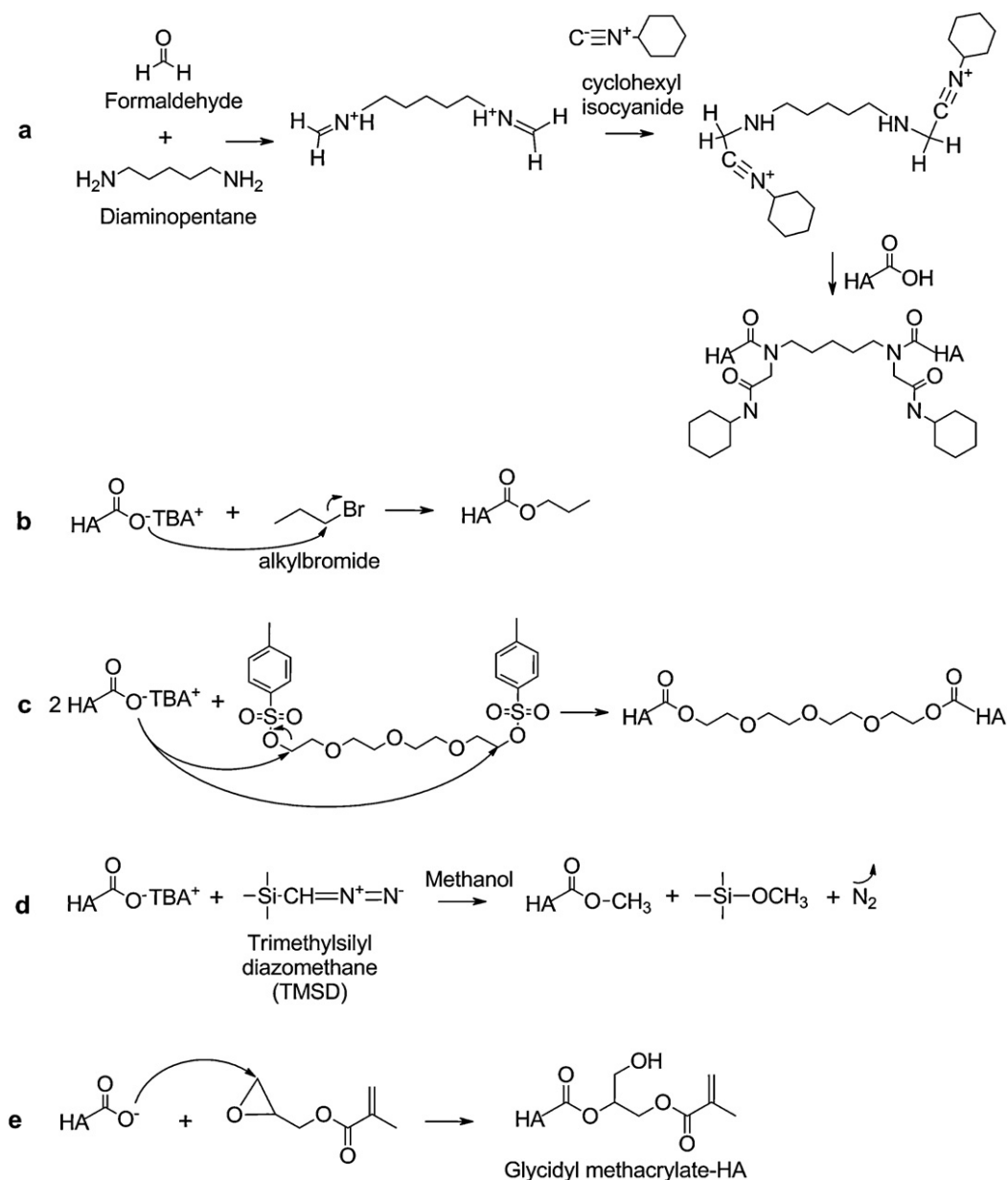


Figura 9 – Reazione di condensazione di Ugi (De Nooy et al., 2000) (a), esterificazione usando alogenuri alchilici (Della Valle & Romeo, 1986) (b), esterificazione con tetraetilene glicole ditosilato (Huin-Amargier et al., 2006) (c), esterificazione mediante l'uso di trimetilsilil diazometano (Hirano et al., 2005) (d), esterificazione con glicidil metacrilato (Bencherif et al., 2008) (e)

Formazione di legami esterei usando diazometano

Jeanloz e Forchielli (1950) furono i primi a riportare l'esterificazione di HA usando diazometano. La reazione è effettuata in un solvente organico, DMSO, partendo dal sale di TBA dell'HA. Hirano et al. (2005) hanno descritto la preparazione del metil estere di HA usando trimetilsilil diazometano (TMSD) come attivatore dei gruppi carbossilici. TMSD reagisce con HA formando un intermedio che poi reagisce con l'acido acetico per ripristinare il metil estere (Figura 9d).

Formazione di legami esterei usando epossidi

Diversi autori hanno descritto la reazione di HA con glicidil metacrilato per sintetizzare l'HA metacrilato (Bencherif et al., 2008; Leach, Bivens, Patrick, & Schmidt, 2003; Prata, Barth, Bencherif, & Washburn, 2010; Weng, Gouldstone, Wu, & Chen, 2008). La reazione è effettuata in acqua in presenza di un eccesso di trietilammina come catalizzatore. Bencherif et al. (2008) suggeriscono che la reazione avviene sul gruppo carbossilico dell'HA e che la trans-esterificazione secondaria sul gruppo ossidrilico è reversibile (Figura 9e).

1.1.2.2. Modificazione dell'-OH

a. Formazione di legami eteri

Formazione di legami eteri usando perossidi

Laurent, Hellsing e Gelotte (1964) furono i primi a riportare la reticolazione di HA. Essi hanno usato l'1,2,3,4-diepossibutano come agente reticolante e hanno effettuato la reazione in condizioni alcaline forti a pH 13–14 (0.2MNaOH e 0.1% sodio boroidruro) e a 50°C per 2 ore. Malson e Lindqvist (1986) hanno brevettato la reticolazione di HA usando butan diolo-diglicidil etere (BDDE) in una soluzione 0.25M di NaOH (Malson & Lindqvist, 1986). Piron poi ha migliorato il metodo miscelando il BDDE ad una soluzione 0.25M di NaOH prima di aggiungerlo alla polvere di HA per ottenere un idrogele più omogeneo (Piron & Tholin, 2002). La reazione consiste nell'apertura dell'anello epossidico per formare un legame eterico con i gruppi ossidrilici dell'HA (Figura 10a). Altri bis epossidi sono stati impiegati per preparare un gel di HA reticolato, come l'etilen glicole diglicidil etere e il poliglicerolo poliglicidil etere (Yui, Okano, & Sakurai, 1992). Quando HA è soggetto ad un tale valore di pH alto (pH>13) sopra il valore di pKa dei gruppi ossidrilici (approssimativamente 10), la maggior parte di essi sono deprotonati e in queste condizioni risultano più nucleofili rispetto ai gruppi carbossilici deprotonati. Gli epossidi

inoltre reagiscono preferenzialmente con i gruppi ossidrilici per formare legami eterei. Tuttavia quando il pH è più basso del valore di pKa del gruppo ossidrilico, una piccola quantità dei gruppi ossidrilici è deprotonata e il gruppo carbossilico anionico è predominante, in queste condizioni la formazione del legame estereo è favorita. Questo è stato dimostrato da De Belder e Malson (1986), che hanno effettuato la reticolazione di HA con BDDE in condizioni acide (pH 2-4.5) (Figura 6b). Tomihata e Ikada (1997a), tuttavia hanno osservato la formazione di un etere e non di legami esterei, anche quando la reticolazione con bisepossidi è stata effettuata in condizioni acide leggere. Ciò probabilmente è dovuto ai valori di pH usati (4.7, 6.1 e 8) ai quali una quantità maggiore di gruppi ossidrilici è deprotonata rispetto a valori di pH inferiori a 4.5. Oggi il BDDE è usato per reticolare la maggior parte degli idrogel di HA che si trovano in commercio. Oltre ad una facile sintesi, i prodotti di degradazione di HA-BDDE non hanno dimostrato alcuna citotossicità e i composti epossidi sono idrolizzati a semplici dioli (Nishi, Nakajima, & Ikada, 1995). Zhao (2000) ha brevettato un metodo per una doppia reticolazione basata su reazioni consecutive di epossidi in condizioni alcaline (pH 10) seguite da condizioni acide (pH 4). L'eossido usato è stato l'epicloridrina e l'1,2,7,8-diepossioottano.

Formazione di legami eterei usando divinil sulfone

La reticolazione di HA usando divinil sulfone (DVS) è stata brevettata da Balazs e Leshchiner (1968). La reazione è effettuata ad alti valori di pH (0.2M NaOH, pH > 13) e porta alla formazione di legami sulfonil bis-etil tra i gruppo ossidrilici dell'HA (Figura 10c). Questa procedura di reticolazione ha il vantaggio di essere effettuata a temperatura ambiente, la quale limita la degradazione di HA in soluzioni alcaline, rispetto alle alte temperature. Balazs e Leshchinger hanno mostrato che la reazione inizia rapidamente dopo l'aggiunta del DVS (5-10 min) e 1 ora è sufficiente per completare la reazione. Essi hanno anche visto che la presenza di sali come NaCl nel mezzo di reazione aumenta il grado di reticolazione. Studi di altri autori hanno confermato l'efficienza del metodo di reticolazione con DVS (Collins & Birkinshaw, 2007; Ramamurthi & Vesely, 2002). Anche se il materiale di partenza, DVS è altamente reattivo e tossico, la biocompatibilità dell'idrogel HA-DVS è stata confermata dalle analisi istologiche.

Formazione di legami eterei usando etilene solfuro

Serban, Yang e Prestwich (2008) hanno usato l'etilene solfuro per sintetizzare il derivato 2-tioetil etere di HA (Figura 10d). L'anello

dell'etilen solfuro è aperto da un attacco nucleofilo del gruppo ossidrilico dell'HA con l'aggiunta di ditionitrito (DTT). La reazione è effettuata a pH 10 per tutta la notte e a pH 8.5 dopo l'aggiunta del DTT per altre 24 ore. Gli autori affermano che se il gruppo carbossilico di HA reagisce con etilene solfuro, si forma un intermedio instabile, il quale si riarrangia in un gruppo carbossilico e riforma l'etilen solfuro. La presenza del gruppo tiolico graftato, il quale non può subire ulteriore reticolazione, è stato dimostrato conferire al polimero un'azione di radical scavenger, che protegge le cellule dalle specie reattive dell'ossigeno.

b. Formazione dell'emiacetale usando glutaraldeide

Diversi autori hanno usato glutaraldeide (GTA) per reticolare l'HA (Crescenzi, Francescangeli, Taglienti, et al., 2003; Tomihata & Ikada, 1997b). Tomihata e Ikada hanno dimostrato la formazione di legami emiacetali tra i gruppi ossidrilici di HA tramite analisi IR (Figura 10e). Inoltre usando la stessa procedura su un polimero contenente solo gruppi ossidrilici, si forma un gel reticolato (Tomihata & Ikada, 1997b).

Gli autori hanno osservato che la reazione può essere effettuata in miscela acetone-acqua ma non in miscela etanolo-acqua, suggerendo

l'inibizione della reazione di reticolazione causata dalla reazione collaterale con il gruppo ossidrilico dell'etanolo. La reticolazione con glutaldeide deve essere iniziata in mezzo acido (pH2) per attivare l'aldeide e catalizzare la reazione. Tuttavia il legame emiacetalico può essere idrolizzato per recuperare il materiale di partenza in condizioni acide. Infatti, Collins and Birkinshaw (2007) hanno dimostrato che il crosslinking con GTA è instabile, ma si può stabilizzare l'idrogel neutralizzandolo attraverso swelling in tampone. La glutaraldeide ha lo svantaggio di essere tossica, per questo sono richieste specifiche precauzioni durante la reazione e la purificazione del prodotto finale.

c. Esterificazione sull'OH

Formazione di legami esterei usando anidride ottenilsuccinica (OSA)

Toemmeraas e Eenschooten (2007) hanno brevettato la modificazione di HA usando le anidridi alchilsucciniche, così come l'anidride ottenilsuccinica, in condizione alcaline (pH9) in acqua. I gruppi ossidrilici di HA reagiscono con l'anidride per formare un legame estereo (Figura 10f). Eenschooten, Guillaumie, Kontogeorgis, Stenby, e Schwach-Abdellaoui (2010) più tardi ottimizzarono i parametri di reazione usando un disegno sperimentale. Valori del 43% di sostituzione possono essere ottenuti utilizzando 50 parti di OSA

rispetto a 1 parte di HA. Tuttavia la reazione è stata abbastanza veloce, con un grado di sostituzione del 18% iniziale ottenuto dopo solo 6 ore.

Formazione di legami esterei utilizzando composti attivati

Pravata et al. (2008) hanno descritto un nuovo metodo per legare ai gruppi ossidrilici di HA un composto carbossilato attivato come acil cloruro ossidrilico per formare dei legami esterei (Figura 10g). I gruppi carbossilici del composto che devono essere legati vengono prima attivati mediante cloroacilazione con cloruro di tionile e poi fatti reagire a temperatura ambiente con HA in un solvente organico. Nei loro studi gli autori hanno usato questo metodo per legare oligomeri di acido polilattico (PLA). Poichè la reazione è stata condotta in un solvente organico (DMSO), HA è stato precedentemente convertito nel sale cetiltrimetilammoniobromuro (CTA). HA-CTA risulta essere più idrofobico e più facile da preparare rispetto a HA-TBA utilizzando un unico step di reazione con CTA-bromuro.

Formazione di legami esterei utilizzando anidride metacrilica

L'esterificazione di HA con anidride metacrilica è stata eseguita per ottenere HA metacrilato (Figura 10h) (Burdick, Chung, Jia,

Randolph,&Langer, 2005; Seidlits et al., 2010; Smeds & Grinstaff, 2001). La reazione è effettuata in acqua fredda per 12 ore a pH 8-10. La presenza di gruppi metacrilici consente la foto-reticolazione del derivato di HA come descritto nel paragrafo 1.1.3.1 sezione d.

d. Formazione del carbammato

MIřcochova et al. (2006) hanno descritto la sintesi di un derivato di HA ottenuto usando ciano bromuro per attivare i gruppi ossidrilici di HA. Si forma così l'estere HA-cianato attivato il quale reagisce con l'ammina per formare principalmente legami carbammici n-sostituiti e il prodotto secondario HA-isourea (Figura 10i). Questa reazione ha il vantaggio di essere effettuata in acqua usando il sale sodico di HA. È stato ottenuto un alto grado di sostituzione fino all'80%, usando solo un leggero eccesso di reagente e un tempo di reazione pari a 1 ora. Tuttavia sono necessari alti valori di pH (fino a 10) per la formazione del legame, che causano una riduzione del peso molecolare della catena polimerica di HA.

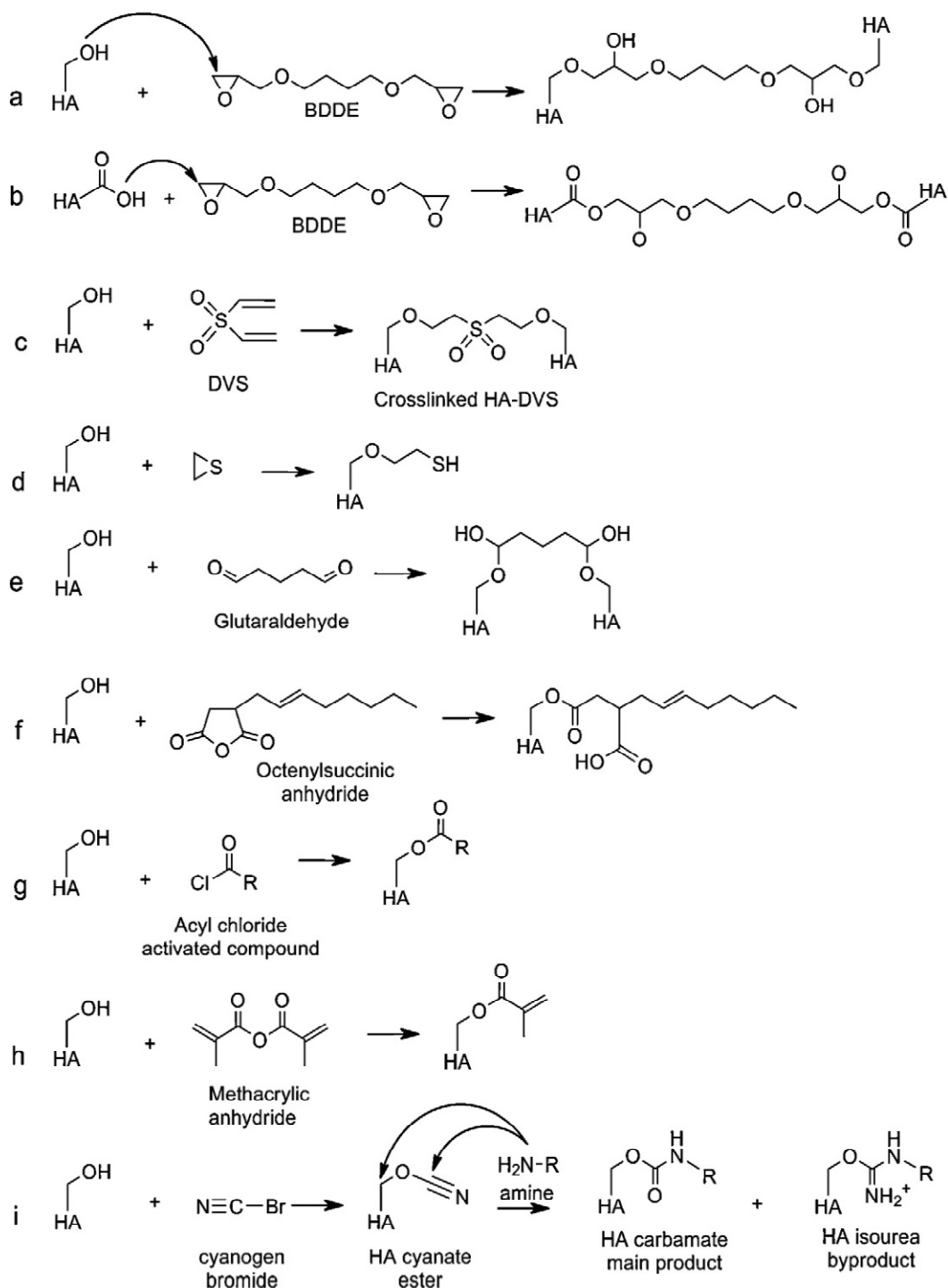


Figura 10 – Reticolazione di HA con BDDE in condizioni alcaline (Malson & Lindqvist, 1986) (a), in condizioni acide (De Belder & Malson, 1986) (b), reticolazione con divinil sulfone (Balazs & Leshchiner, 1968) (c), modificazione di HA con etilene solfuro (Serban et al., 2008) (d), reticolazione con glutaraldeide (Tomihata & Ikada, 1997b) (e), modificazione di HA con anidride ottenilsuccinica (Toemmeras & Eenschooten, 2007) (f), con acilcloruri attivati (Pravata et al., 2008) (g), con anidride metacrilica (Seidlits et al., 2010) (h), attivazione con ciano bromuro e formazione del carbammato (Ml̃cochova et al., 2006) (i)

e. Ossidazione con sodio periodato

Gruppi aldeidici vengono prodotti sull'HA in seguito a reazione con sodio periodato, il quale ossida i gruppi ossidrilici della porzione glucuronica di HA a dialdeidi attraverso apertura dell'anello zuccherino (Jia, Colombo, Padera, Langer & Kohane, 2004). Gli studi effettuati indicano un decremento del peso molecolare in seguito alla reazione da 1.3MDa per l'HA di partenza a 260KDa per il risultante HA aldeide. Questo metodo è stato usato per legare peptidi sui gruppi aldeidici (Glass, Dickerson, Stecker, & Polarek, 1996) o per reticolare con derivati HA-idrazinici allo scopo di veicolare la bupivacaina (Jia et al., 2004). Comunque questa reazione porta ad un significativo decremento del peso molecolare di HA.

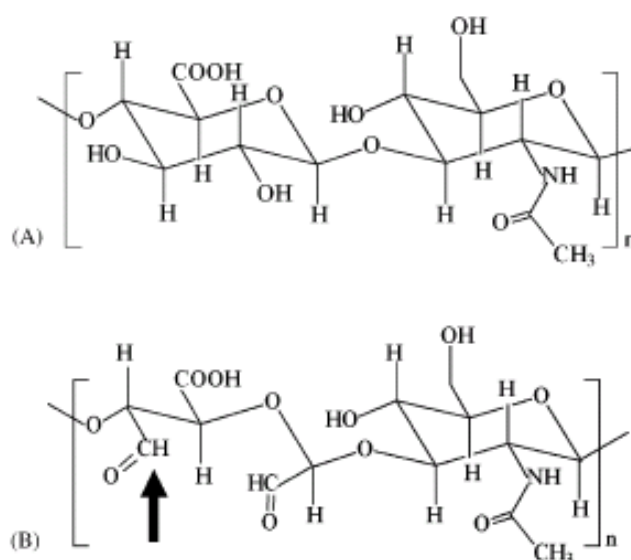


Figura 11 – Acido ialuronico (A) non modificato, (B) ossidazione con periodato ad HA-aldeide

1.1.2.3. Modificazione del $-NHC(=O)CH_3$

La deacetilazione del gruppo N-acetilico di HA ripristina un gruppo amminico il quale può poi reagire con un acido usando lo stesso metodo di amidazione descritto nella paragrafo 1.1.2.1 sezione **a**. La deacetilazione è usualmente effettuata usando idrazina solfato per un periodo di 5 giorni a 55°C. Tuttavia tale trattamento comporta una marcata frammentazione della catena (Bellini & Topai, 2000). Da allora si è notato che anche i trattamenti più blandi inducono degradazione della catena di HA tramite eliminazione della porzione glucuronica (Bulpitt & Aeschlimann, 1999; Crescenzi et al., 2002; Dahl, Laurent, & Smedsrod, 1988). Bellini e Topai (2000) hanno brevettato l'amidazione di HA tramite reazione di un acido con il gruppo ammino deacetilato di HA. L'acido è stato prima attivato usando una carbodiimmide; l'ammina deacetilata di HA reagisce con l'acido attivato e forma il legame ammidico (Figura 12).

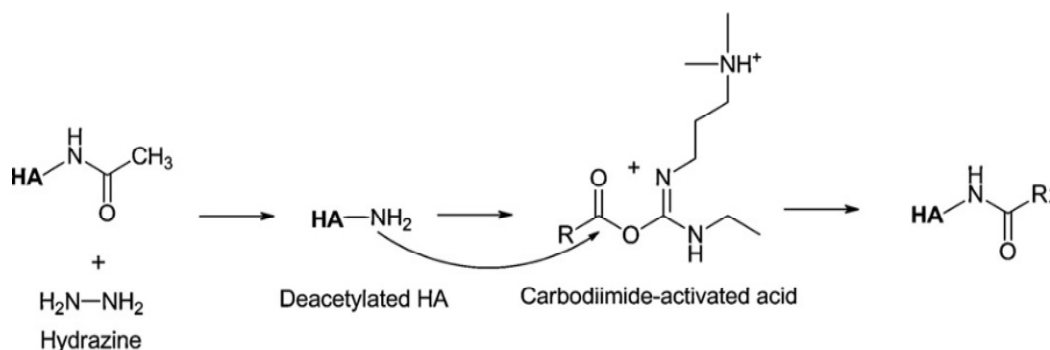


Figura 12 – Deacetilazione e amidazione di HA

Oerther et al. (2000) hanno usato questo metodo per reticolare l'HA con il gruppo carbossilico dell'acido alginico. Crescenzi et al. (2002) hanno usato l'HA deacetilato per un'ulteriore reticolazione usando la condensazione di Ugi (Figura 9a). Il gruppo ammino deacetilato reagisce con il gruppo carbossilico di HA per formare un idrogel autoreticolato. Platt e Szoka descrivono la possibilità di usare enzimi per la deacetilazione di HA, procedura che in precedenza è stata effettuata sulla porzione N-acetilglucosamminica dell'eparina e dell'eparina solfato (Duncan, Liu, Fox & Liu, 2006; Platt & Szoka, 2008).

1.1.3. Derivati dell'HA

Numerosi derivati dell'HA sono stati descritti in letteratura, studiati per diverse applicazioni, in particolare per il rilascio di farmaci. Di seguito vengono presentati diversi esempi di derivati dell'HA e i loro metodi di sintesi.

1.1.3.1. Idrogeli di HA per supplementazione

a. Reticolazione chimica diretta

A causa della loro corta emivita dopo iniezione, la maggior parte delle soluzioni di HA prodotte in commercio e utilizzate per iniezioni articolari (come Synvisc® by Genzyme) e per riempimento dermico

(Restylane® by QMed, Juvederm® by Allergan, Teosyal® by Teoxane, Glytone® by Pierre Fabre, ecc.) vengono stabilizzate mediante reticolazione, per ottenere idrogel con maggiori tempi di permanenza e maggiore resistenza meccanica. I produttori affermano che la durata dell'effetto di un riempimento dermico va da 6 a 12 mesi in dipendenza del prodotto, come verificato su casi clinici (Bennett & Taher, 2005; Lemperle, Morhenn, & Charrier, 2003; Narins et al., 2003; Piacquadio, Jarcho, & Goltz, 1997). Molti idrogel di HA iniettabili presenti in commercio sono reticolati con butandiolo diglicidil etere (BDDE) (Sall & Ferard, 2007) (Figura 10a e b). Altri agenti reticolanti comunemente usati sono il divinilsulfone (Figura 10c) o la glutaraldeide (Figura 10e), come descritto in precedenza. Con lo scopo di ottenere derivati con tempi di permanenza in situ più lunghi, dopo l'iniezione, ulteriori tecniche per la sintesi di derivati di HA sono continuamente esplorate. Per esempio, Collins and Birkinshaw (2007, 2008a) hanno comparato differenti agenti reticolanti per identificare i più efficaci. Zhao (2000) ha brevettato un procedimento di doppia reticolazione di HA, soggetta a due consecutive reazioni di reticolazione con bisepossidi, la prima ad alti pH (10) e la seconda a bassi pH (4). L'idrogel risultante doppiamente reticolato ha dimostrato una bassa capacità di assorbire acqua e

nessuna degradazione quando soggetto a digestione con ialuronidasi rispetto all'idrogel reticolato una sola volta.

b. Reticolazione chimica di HA funzionalizzato

Alcuni autori hanno descritto la reticolazione dei derivati HA-ammino o HA-idrazide ottenuti con i più comuni reticolanti commerciali omofunzionali o eterofunzionali (Bulpitt & Aeschlimann, 1999; Pouyani & Prestwich, 1994a). Questi reticolanti includono il bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS^3), il 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidil)propionato (DTSSP) o il 2-metilsuberimidato (DMS)(Figura 13). Essi reagiscono con i derivati dell'HA-idrazide a valori di pH superiori a 5 o con i derivati HA-ammino a valori di pH superiori a 8 dovuti al più alto pKa dei gruppi amminici (vedi Figura 7e)(Bulpitt & Aeschlimann, 1999). La biocompatibilità dei risultanti gel reticolati è stata attentamente studiata per vedere come tali idrogel sono degradati dai processi enzimatici (Jedrzejewski & Stern, 2005). La liberazione in situ di prodotti idrazidici potrebbe comportare effetti collaterali potenzialmente tossici, i quali devono essere valutati usando metodi in vivo (Bulpitt & Aeschlimann, 1999).

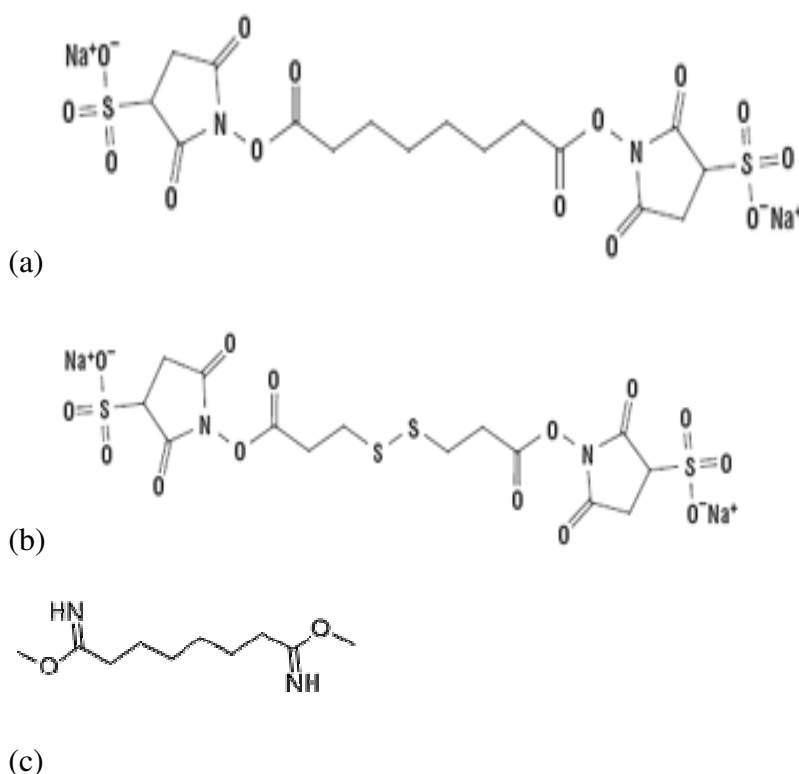


Figura 13 – Bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS³) (a), 3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidil)propionato (DTSSP) (b), il 2-metilsuberimidato (DMS) (c)

c. Reticolazione in situ di HA funzionalizzato

Shu, Liu, Luo, Roberts, e Prestwich (2002) hanno formato idrogel tramite reticolazione di derivati HA tiolici con formazione di ponti disolfuro (Figura 14a). Kurisawa, Chung, Yang, Gao, e Uyama (2005) hanno sintetizzato in situ idrogeli reticolati da tiramina legata ad HA attraverso trattamento con perossidasi di rafano e H₂O₂. Il derivato HA-tiramina è stato sintetizzato con EDC e HOBt. La formazione dell'idrogel è stata effettuata in situ usando 2 siringhe, una contenente HA-tiramina e H₂O₂ e la seconda contenente perossidasi di rafano per indurre la reazione di reticolazione, che procede alla posizione C-C e

C-O tra le funzioni fenoliche, come mostrato in Figura 13b. L'idrogel reticolato in situ è stato dimostrato essere biocompatibile.

Oh et al. (2010) hanno recentemente riportato la formazione di idrogeli di HA da derivati funzionalizzati contenenti gruppi reattivi gli uni verso gli altri. Per esempio, HA-amminoetil metacrilato o HA-amminopropil metilacrilammide composti da doppi legami che possono reagire con HA contenente gruppi tiolici come HA-cisteamina (Figura 14c). Per questa reazione non sono richiesti reagenti ulteriori e non si ha formazione di sottoprodotti tossici, pertanto costituisce un metodo adeguato per la formazione in situ di idrogeli di HA.

d. Fotoreticolazione di HA funzionalizzato

Diversi autori hanno anche descritto la sintesi di idrogeli di HA tramite fotoreticolazione (Bencherif et al., 2008; Leach et al., 2003). I prodotti HA-metacrilato ottenuti dalla reazione con glicidil metacrilato (Paragrafo 1.1.2.1 sezione c) (Figura 9e) o con anidride metacrilica (Paragrafo 1.1.2.2 sezione c) (Figura 10h) sono stati reticolati tramite polimerizzazione di radicali liberi quando soggetti a luce UV (365nm) in presenza di un fotoiniziatore come l'acido 2-osso-chetoglutarico o il 4-(2-idrossietossi)fenil-(2-idrossi-2-propil)

chetone (commercialmente chiamato Irgacure 2959 prodotto da Ciba Specialty Chemicals, Switzerland) (Figura 14d).

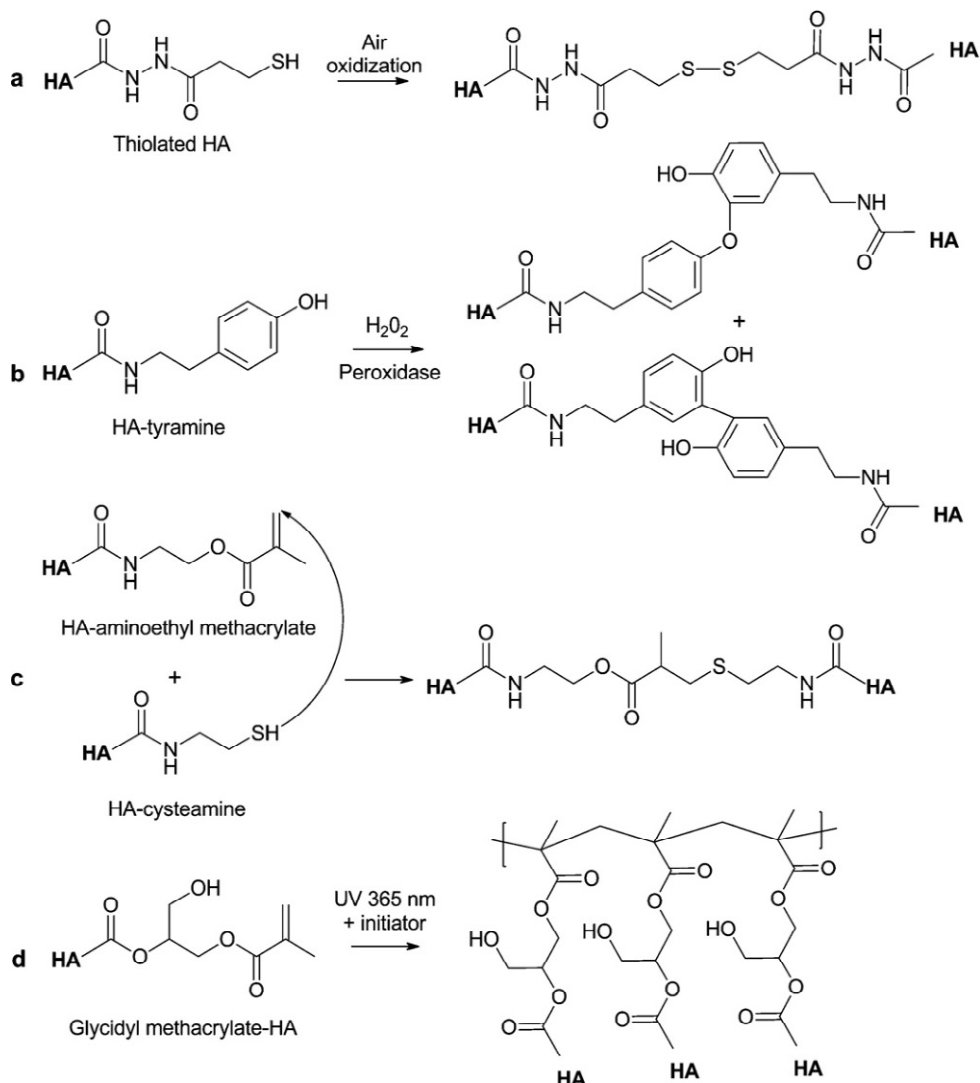


Figura 14 – Reticolazione in situ del derivato HA-tiolato (Shu et al., 2002) (a), di HA-tiramina mediante ossidazione (Kurisawa et al., 2005) (b), di due differenti derivati dell'HA (Oh et al., 2010) (c). Fotoreticolazione di HA-glicidil metacrilato (Leach et al., 2003) (d)

e. Idrogel fisici

Come alternativa agli idrogel reticolati chimicamente, alcuni autori hanno sintetizzato derivati anfifilici di HA per mezzo di legami graft con catene idrofobiche come esadecilamina (Borzacchiello, Mayol, Schiavinato, & Ambrosio, 2010) o acido polilattico (Palumbo, Pitarresi, Mandracchia, Tripodo, & Giammona, 2006). I risultanti polimeri associativi formano interazioni forti tra le catene idrofobiche, le quali sono interrotte quando soggette a forti forze esterne, come in un tipico comportamento elastico. I derivati di HA anfifilici così ottenuti si comportano come geli comparati all'iniziale fluido viscoso dell'HA di partenza.

1.1.3.2. Coniugati di HA per il rilascio di farmaci

a. Coniugati HA-farmaco

La coniugazione di farmaci ad HA è stata effettuata già nel 1991 per il miglioramento del rilascio di principi attivi (Drobnik, 1991). Questa tecnica ha lo scopo di formare un profarmaco tramite legami covalenti del farmaco ad HA. Il farmaco è rilasciato una volta che il legame covalente viene idrolizzato nell'organismo, idealmente nello specifico sito target. Vercruysse et al. (1998) rivedendo questi studi hanno dimostrato che la coniugazione dei farmaci ad HA, migliora il loro effetto terapeutico. Pouyani e Prestwich (1994a) hanno descritto il

legame dell'ibuprofene, un farmaco antiinfiammatorio non steroideo, o dell'idrocortisone, un farmaco antiinfiammatorio steroideo destinati a iniezioni locali nel ginocchio artritico. HA viene prima coniugato con diidrazide adipica (ADH) e l'ibuprofene viene convertito nell'estere attivato usando una carbodiimide e NHS. Entrambi gli intermedi poi reagiscono insieme per formare un legame idrazidico (Figura 15a). L'idrocortisone è stato legato a HA-ADH tramite il suo derivato emisuccinato, precedentemente convertito nell'estere attivato nello stesso modo come per l'ibuprofene (Figura 15b). In questo modo si forma un legame estereo tra HA e idrocortisone che è più facilmente idrolizzato dai meccanismi enzimatici del nostro corpo per rilasciare l'idrocortisone iniziale. Il paclitaxel è stato coniugato a HA in un modo simile all'idrocortisone per mezzo del suo estere attivato emisuccinato NHS sull'HA-ADH (Luo & Prestwich, 1999). Il paclitaxel è un agente chemioterapeutico antimitotico scarsamente solubile, il quale causa la morte delle cellule tumorali distruggendo il processo mitotico. La sua solubilità è stata notevolmente aumentata tramite coniugazione con HA. Inoltre studi suggeriscono che, usando questo metodo, il paclitaxel potrebbe essere rilasciato dentro le cellule tumorali e tramite l'idrolisi enzimatica intracellulare del legame estereo potrebbe svolgere la sua attività (Luo, Ziebell, & Prestwich,

2000). Anche proteine sono state coniugate a HA-idrazide in un modo simile (Marecak, 2001). Il coniugato HA-proteina ha dimostrato una maggiore permanenza nel circolo sanguigno rispetto alle formulazione con le sole proteine.

Molti esempi di coniugati HA-farmaco che sono stati sintetizzati usando la chimica delle carbodiimmidi sono stati preparati dall'intermedio HA-idrazide e non dalla forma nativa di HA. Infatti Vercruysse et al. (1998) hanno affermato che i farmaci non sono direttamente legati ad HA per evitare la formazione di sottoprodotti come l'N-acilurea (vedi anche il paragrafo 1.1.2.1 sezione a).

In alternativa, Xin, Wang, & Xiang (2010) hanno poi descritto la coniugazione di paclitaxel sull'HA usando carbodiimmidi tramite aminoacidi linker. In particolare un aminoacido viene precedentemente legato tramite il suo gruppo carbossilico al gruppo ossidrilico di paclitaxel. L'intermedio è stato poi coniugato tramite il gruppo ammino dell'amminoacido sul gruppo carbossilico dell'HA usando come attivanti EDC e NHS in DMF (Figura 15c). L'idrolisi della carbodiimmide è stata minimizzata dall'uso di un solvente organico anidro ed è stato ottenuto un grado di sostituzione pari al 10-15%. Gli autori confermano la formazione di nanoparticelle in soluzioni acquose dovute alla natura anfifilica del coniugato HA-

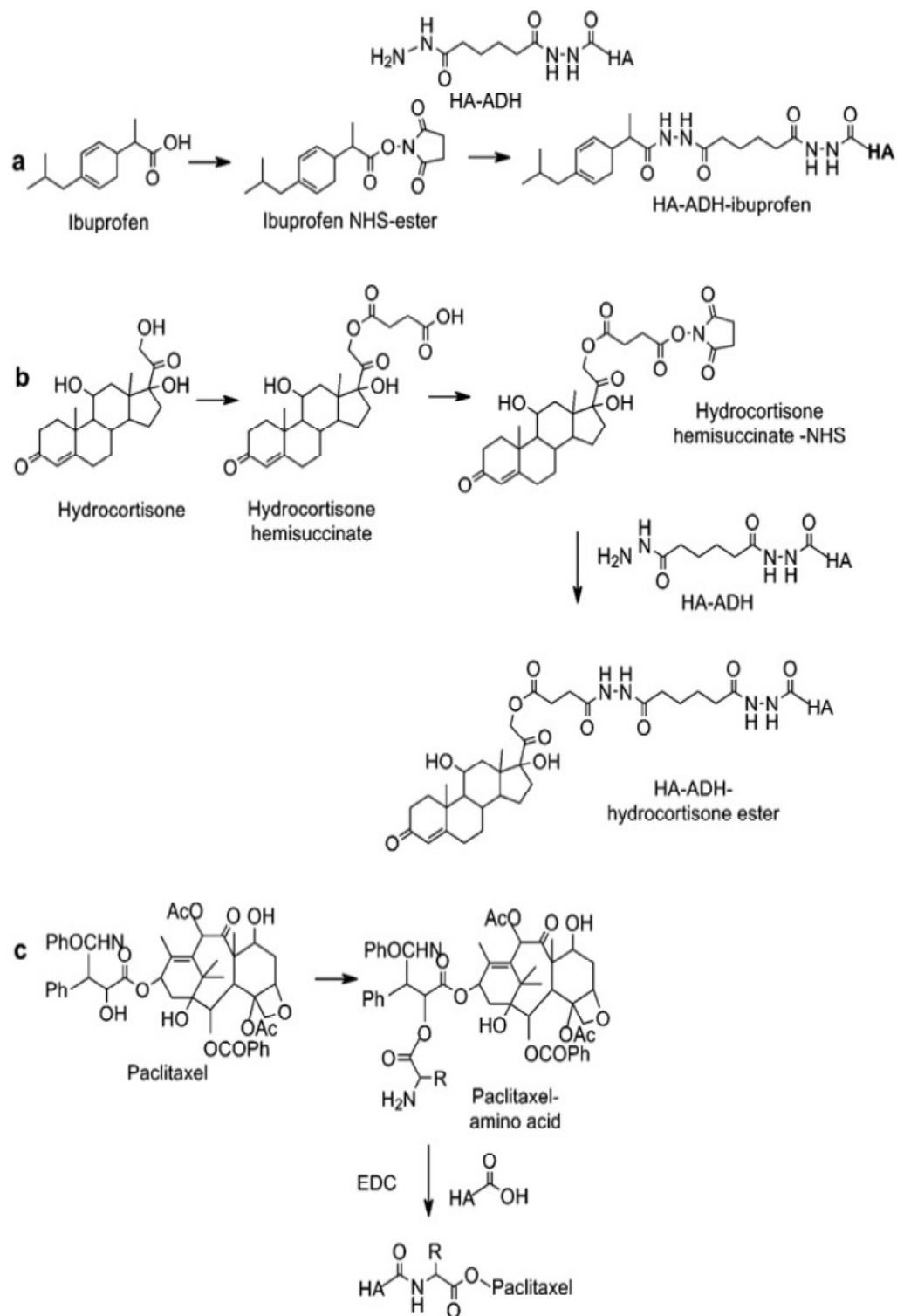
aminoacido-paclitaxel. Il paclitaxel (idrofobico) è probabilmente intrappolato dallo shell esterno idrofilico dell'HA. Un alto livello di rilascio del farmaco è stato osservato per il coniugato HA-ADH-paclitaxel descritto da Luo e Prestwich (1999). Gli autori suggeriscono che questa differenza è dovuta all'effetto elettron attrattore del gruppo ammino protonato, il quale indebolisce il legame estereo e facilita invece la sua idrolisi e il rilascio del paclitaxel (Xin et al., 2010). Un'altra ipotesi potrebbe essere il facile riconoscimento da parte delle esterasi grazie alla presenza di un amminoacido. Questo metodo offre nuove prospettive per la coniugazione di farmaci all'HA usando differenti linker, più biocompatibili e che permettono di modulare il rilascio del farmaco. Farmaci come gli antibiotici antracicline che contengono gruppi amminici possono anche essere coniugati al gruppo ossidrilico dell'HA sfruttando l'attivazione con ciano bromuro come descritto nel paragrafo 1.1.2.2 sezione d (vedi Figura 10i) (Cera, Terbojevich, Cosani, & Palumbo, 1988). I legami carbammico e idrazidico non sono degradati enzimaticamente a differenza del legame estereo. Inoltre, con il legame del farmaco sul gruppo ossidrilico, il gruppo carbossilico dell'HA resta immutato, conservando la funzione naturale di riconoscimento e la biodegradabilità dovuta agli enzimi, le quali possono essere

vantaggiose per l'internalizzazione nella cellula. Il rilascio del farmaco può quindi essere velocizzato rispetto al farmaco coniugato sul gruppo carbossilico dell'HA. Infatti più rapidamente lo shell protettivo attorno al farmaco coniugato viene degradato, tanto più rapidamente il farmaco viene rilasciato. Altri farmaci contenenti gruppi ossidrilici, come il cortisone, l'idrocortisone e il fluorocortisone, vengono coniugati all'HA tramite l'esterificazione brevettata da Fidia (Della Valle & Romeo, 1986). Il coniugato HA-metilprednisolone è un altro esempio (Kyyronen et al., 1992). Leonelli et al. (2005) hanno suggerito un altro metodo per coniugare paclitaxel ad HA tramite esterificazione mediata da un derivato del paclitaxel con acido 4 amminobutanoico. Questo derivato ha reagito con HA-TBA in Nmetil-2-pirrolidone (NMP) per un periodo di 7 giorni. Tuttavia questo solvente è più tossico della DMF e la reazione è molto lunga. Rosato et al. (2006) hanno dimostrato che il coniugato HA-paclitaxel ha una alta attività antitumorale rispetto al farmaco libero. Recentemente, Platt e Szoka (2008) hanno rivisto una serie di studi esaminando i coniugati HA-farmaco per la loro selettiva capacità di internalizzarsi nelle cellule mediata dal recettore CD44. Il farmaco coniugato sarà internalizzato insieme all'HA e rilasciato all'interno della cellula una volta che gli enzimi intracellulari hanno idrolizzato il

legame covalente (Coradini, Pellizzaro, Miglierini, Daidone, & Perbellini, 1999; Luo, Kirker, & Prestwich, 2000; Luo, Ziebell, et al., 2000). Le cellule tumorali hanno mostrato una sovraespressione del recettore CD44, permettendo il direccionamento del farmaco al tumore (Platt & Szoka, 2008). Coradini et al. hanno coniugato l'acido butirrico, un inibitore della crescita delle cellule tumorali, partendo dalla anidride butirrica in DMF e da HA in presenza di piridina o dimetil amino piridina. L'anidride reagisce con il gruppo ossidrilico di HA e forma dei legami esterei nello stesso modo dell'anidride metacrilica, come descritto nel paragrafo 1.1.2.2 sezione c (Figura 15d). Il coniugato HA-acido butirrico ha dimostrato un miglioramento dell'adesione cellulare ed una migliorata attività antitumorale (Coradini et al., 1999). Cai, Xie, Bagby, Cohen, e Forrest (2008) hanno studiato la coniugazione del cisplatino sull'HA con lo scopo di ridurre la nefrotossicità. Cisplatino è stato legato ai gruppi carbossilici dell'HA con l'uso di nitrato d'argento come agente attivante (Figura 15e), tale coniugato ha mostrato un incremento della concentrazione di farmaco nel tessuto interessato e un rilascio prolungato del farmaco stesso. Recentemente, Homma et al. (2009) hanno descritto la sintesi del coniugato HA-metotrexato con ridotti effetti collaterali per essere usato nel trattamento delle osteoartriti. Il metotrexato è stato legato

all'HA mediante una piccola sequenza peptidica e uno spaziatore PEG-diamino, con un grado di sostituzione dell'1-3%. Nel primo step è stato sintetizzato il composto metotrexato-peptide-PEG-ammino mediante una reazione multisteps usando la chimica della carbodiimmide in DMF. Il gruppo ammino terminale del composto ha poi reagito con il gruppo carbossilico dell'HA mediante EDC e HOBt in tetraidrofurano e acqua. Gli autori hanno osservato che la catena peptidica è risultata necessaria per mantenere l'efficacia del farmaco, suggerendo che può promuovere il riconoscimento del coniugato da parte dell'enzima, il quale è essenziale per il rilascio del farmaco e l'espletamento della sua attività biologica. Lo spaziatore PEG è stato aggiunto per promuovere l'accesso dell'enzima alla catena peptidica. Un ulteriore studio ha determinato che la catena peptidica ottimale per questo scopo è stata fenilalanina-fenilalanina, con l'etilendiamina come linker e che il grado di sostituzione può essere aumentato da 1.3% a 3.8% (Homma et al., 2010)(Figura 15f). Kong, Oh, Chae, Lee, e Hahn (2010) hanno anche recentemente presentato un nuovo metodo per la coniugazione del peptide antidiabetico exendin-4, sull'HA mediante un intermedio vinil sulfone cisteamina. Nel primo step viene preparato l'intermedio vinil sulfone cisteamina dal divinil sulfone e dalla cisteamina idrocloruro. Il gruppo amminico poi reagisce con

HA-TBA in DMSO per formare l'HA-vinilsulfone cisteamina tramite processo di ammidazione. Il gruppo vinilico dell'intermedio poi reagisce con il gruppo cisteinico terminale dell'exendina-4 per formare un legame covalente (Figura 15g). Il coniugato ottenuto ha dimostrato un'aumentata emivita e una migliore azione ipoglicemizzante rispetto al farmaco libero. Kim, Checkla, Dehazya, and Chen (2003) hanno riportato la preparazione di una matrice reticolata di HA contenente DNA. Il processo di reticolazione è stato effettuato usando idrazide adipica e EDC. La matrice ottenuta ha dimostrato un graduale rilascio di DNA, il quale è un buon risultato se comparato al DNA non protetto o ai sistemi liposomici con profili di rilascio rapidi.



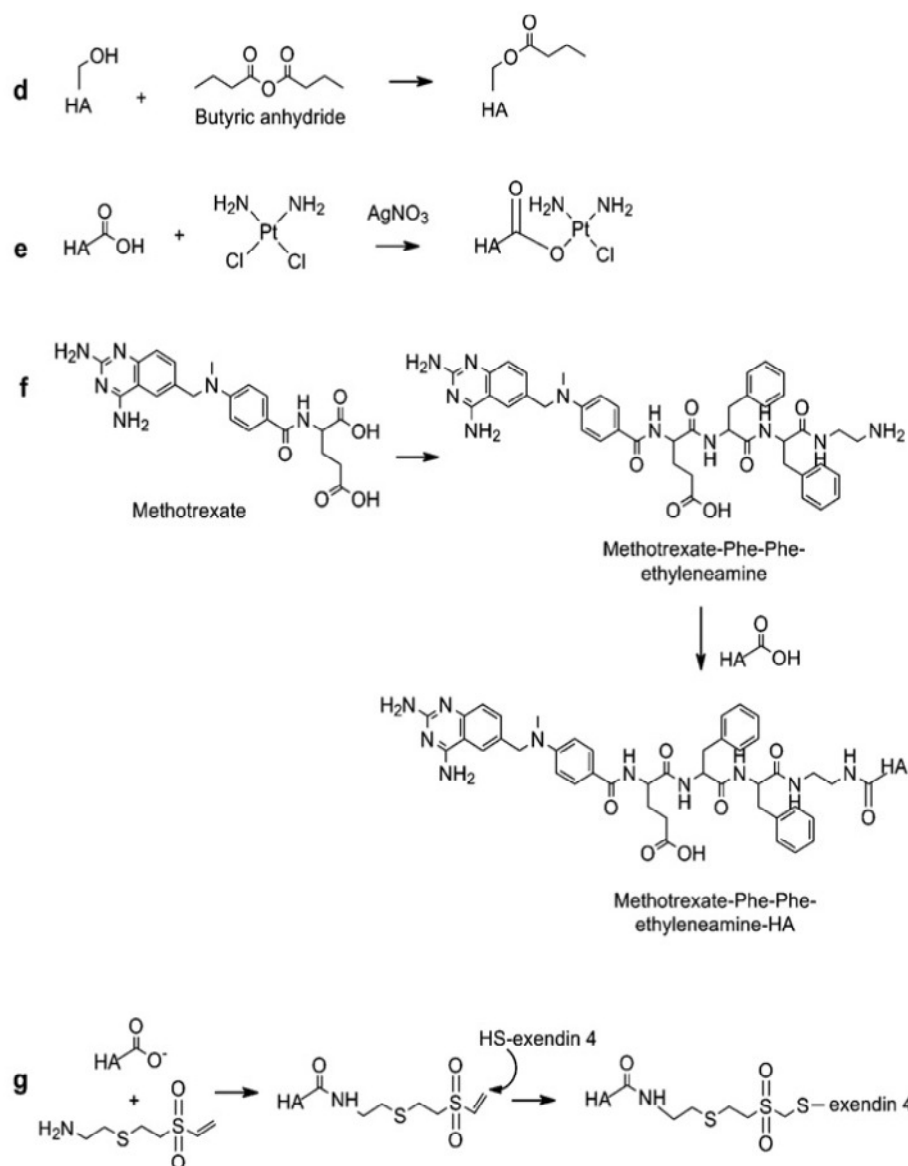


Figura 15 – Coniugazione sull’HA-ADH dell’ibuprofene (Pouyani & Prestwich, 1994a) (a), dell’idrocortisone emissuccinato (Pouyani & Prestwich, 1994a) (b), coniugazione di Paclitaxel mediante un amminoacido linker (Xin et al., 2010) (c). coniugazione dell’acido butirrico (Coradini et al., 1999) (d), coniugazione HA-cisplatino (Cai et al., 2008) (e), coniugazione di HA-metotrexato mediante un peptide phe-phe e etilendiammina (Homma et al., 2010) (f), coniugazione di HA-4exendina mediante vinyl sulfone (Kong et al., 2010) (g)

b. Coniugazione di HA a sistemi carrier

Coniugazione di HA a liposomi

Yerushalmi, Arad e Margalit (1994) hanno usato la coniugazione covalente di HA come rivestimento di liposomi. I gruppi carbossilici di HA sono stati legati ai gruppi amminici della fosfatidiletanolamina dei liposomi usando la chimica delle carbodiimmidi (Figura 16). Peer e Margalit (2004a, 2004b) hanno dimostrato che i liposomi rivestiti covalentemente con HA resistono più tempo in circolo rispetto a quelli non rivestiti. I farmaci incapsulati nei liposomi si accumulano nelle cellule tumorali e ne riducono la crescita, dando bassa tossicità sistemica. Taetz et al. (2009) hanno recentemente utilizzato i coniugati HA-liposomi per il rilascio di siRNA nelle cellule cancerose del polmone.

Coniugazione di HA a nanoparticelle

Rivkin et al. (2010) hanno incapsulato il paclitaxel all'interno di lipidi contenenti fosfatidiletanolamina, i quali sono stati ulteriormente legati covalentemente con HA. Le nanoparticelle formate hanno mostrato una buona efficienza come nanovettori selettivi per le cellule tumorali.

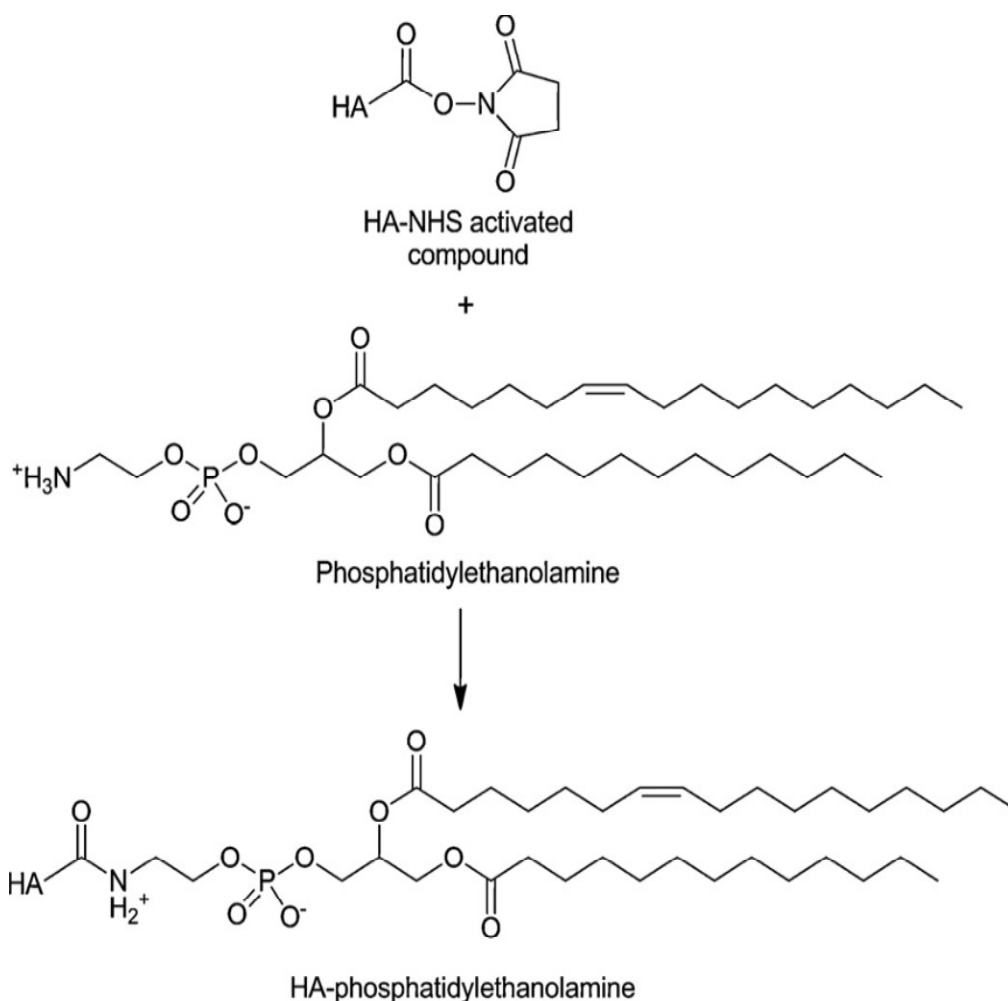


Figura 16 – Coniugazione di HA ai liposomi (Yerushalmi et al., 1994)

Sistemi nanoparticellari sono stati formati anche coniugando l'HA all'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) mediante uno spaziatore polietilenglicole (PEG) (Hyung et al., 2008; Yadav et al., 2007). Entrambi PLGA e HA sono stati prima attivati con EDC e NHS, poi miscelati insieme con una diammina come linker. Le nanoparticelle sono state caricate con doxorubicina e hanno mostrato un aumento dell'efficacia del farmaco rispetto alle nanoparticelle formate da solo PLGA.

c. Coniugati di HA (reticolati o modificati) come sistemi per il rilascio modificato di farmaci

Come alternativa alla coniugazione di HA sulle particelle, alcuni autori hanno descritto le sintesi di derivati di HA per formare loro stessi particelle o altri sistemi per il rilascio di farmaci. Per esempio Choi et al. (2009) hanno riportato la modificazione di HA con l'acido 5 β -colanico (che è un composto idrofobico) mediante un'amminoetilammide come linker usando EDC e NHS in DMF. Il derivato anfifilico ottenuto ha formato nanoparticelle in condizioni fisiologiche e ha mostrato una prolungata permanenza nel circolo sanguigno e un'alta affinità per le cellule tumorali in vitro. Queste nanoparticelle sono quindi promettenti carrier di farmaci tumorali. Nanogel di HA per il rilascio di siRNA sono stati descritti da Lee, Mok, Lee, Oh, e Park (2007). Inizialmente, è stato preparato il coniugato HA-tiolo usando il metodo della carbodiimide con cisteamina, seguita dal trattamento con ditionitrotolo (DTT) per rompere i ponti disolfuro. Il nanogele di HA reticolato è stato poi formato mediante il metodo dell'emulsione inversa partendo da una soluzione di HA-tiolo contenente siRNA durante il quale i ponti disolfuro si sono formati. Il metodo dell'incapsulazione indotta non danneggia gli siRNA e il processo di riconoscimento da parte del recettore CD44 espresso dalle

cellule. Microsfere preparate dall'estere dell'HA, ottenute usando alogenuri alchilici, sono state usate come sistemi di rilascio per farmaci come l'idrocortisone (Benedetti, Topp & Stella, 1990). Gli autori hanno osservato che l'idrocortisone è stato rilasciato velocemente quando incapsulato dentro le microsfere di HA rispetto a quando il farmaco viene covalentemente legato all'HA.

Esposito et al. (2005) hanno anche formato microsfere da esteri di HA usando o il metodo spray-drying o il metodo dell'emulsione inversa. Nel primo caso il farmaco è stato dissolto in una soluzione contenente il derivato estereo dell'HA e sottoposto a *spray drying*. Nell'altro caso è stata formata un'emulsione acqua in olio contenente il derivato estereo dell'HA e il farmaco (nella fase acquosa) utilizzando come tensioattivi il sorbitan trioleate (Span® 85). Dehazya e Lu (2002) hanno brevettato il processo di produzione delle microsfere di HA per emulsione inversa. Dopo, Yun, Goetz, Yellen, e Chen (2004) hanno riportato la preparazione di microsfere di HA usando la carbodiimide e idrazide adipica combinata con il metodo dell'emulsione inversa. Un plasmide di DNA è stato incorporato nelle microsfere miscelandolo alla soluzione di HA prima dell'aggiunta dell'agente reticolante. Le microsfere ottenute hanno dimostrato di rilasciare il plasmide di DNA strutturalmente intatto e di trasfettare nelle cellule in vitro e in vivo.

Recentemente, Lai et al. (2010) hanno descritto un idrogel di HA reticolato con una carbodiimide per un potenziale uso come sistema di rilascio di uno strato di cellule. Gli autori hanno mostrato un miglioramento della biocompatibilità oculare rispetto a dischi di HA reticolati con glutaraldeide. Questo sembra essere un promettente approccio dato che i foglietti di cellule ingegnerizzati sono una tecnica emergente nell'ingegneria tissutale (Yang et al., 2006). Luo, Kirker, et al. (2000) hanno riportato la preparazione di un film di HA reticolato caricato con un farmaco per il rilascio sostenuto nelle ferite. Il farmaco è stato dissolto nella soluzione di HA-ADH prima di intrappolarlo all'interno della rete dell'idrogel mediante reticolazione. È stata anche riportata la formazione di materiali compositi mediante legami covalenti tra HA e altri polimeri, come la carbossimetilcellulosa (Burns et al., 1991), poli(vinil alcool) o poli(acidi acrilici) (Cascone, Sim, & Sandra, 1995). Un recente esempio sviluppato da Antunes et al. (2010) sono scaffold ibridi macroporosi di acido polilattico(PLLA) rivestiti con HA. Gli scaffold di PLLA preformati sono stati immersi in una soluzione di HA la quale è stata poi reticolata in miscela acqua/acetone con glutaraldeide. Le applicazioni per questi tipi di materiali generalmente riguardano l'ingegneria tissutale dell'osso.

d. Derivati di HA non covalenti

L'HA nativo è stato utilizzato per incapsulare l'ofloxacin all'interno delle microsfere ottenute tramite spray-drying di una soluzione contenente entrambi HA e ofloxacin (Hwang, Kim, Chung, & Shim, 2008).

Le microsfere hanno mostrato un aumentato assorbimento di ofloxacin rispetto alle microsfere senza HA e una migliore distribuzione nel polmone. Kim, Hahn, Kim, Kim, e Lee (2005) hanno descritto l'uso delle microsfere per il rilascio sostenuto di proteine ricombinanti terapeutiche. Le microsfere sono state ottenute per spray-drying da una soluzione di HA nativo che comprende le proteine, in questo caso un ormone della crescita ricombinante umano, e un tensioattivo non ionico, il polisorbato 80 (Tween® 80). Le microparticelle ottenute sono state ulteriormente miscelate con una soluzione di lecitina e sottoposte nuovamente a spray-drying. Nonostante le proteine ricombinanti siano facilmente denaturate durante lo spray-drying, gli autori non hanno osservato apprezzabile denaturazione. Questa formulazione ottimizzata ha mostrato un prolungato rilascio dopo l'iniezione. Questi risultati sono veramente promettenti per il rilascio di proteine terapeutiche, specialmente in termini di ridotta frequenza delle somministrazioni, uno dei principali

problemi in questa area di ricerca. I sistemi di rilascio delle proteine di questo tipo sono stati rivisti recentemente da Oh et al. (2010). Le cariche negative dei gruppi carbossilici dell'HA sono state anche usate sotto forma di ioni complessi con composti con cariche positive. Per esempio, l'HA è stato miscelato con il fattore di necrosi tumorale carico positivamente correlato al ligando inducente apoptosi (TRAIL) per formare ioni complessi non covalenti. Questi nanocomplessi hanno mostrato una prolungata circolazione nel sangue in vivo, e inoltre un prolungato effetto terapeutico antitumorale (Na et al., 2008). Le nanoparticelle formate da ioni complessi di HA e cisplatino sono stati descritti da Jeong et al. (2008). In soluzioni acquose, il cisplatino è carico positivamente e forma dei complessi ionici con HA in seguito a semplice miscelazione in acqua per tre giorni. Saettone, Giannaccini, Chetoni, Torracca, e Monti (1991) hanno precedentemente descritto la formazione di complessi ionici con pilocarpina, i quali hanno mostrato una migliorata biodisponibilità per il rilascio oftalmico. Allo stesso modo, liposomi con carica positiva sono stati rivestiti non covalentemente mediante complessazione ionica con le cariche negative dell'HA (Esposito, Geninatti Crich & Aime, 2008). Jederstrom, Andersson, Grasjo e Sjoholm (2004) hanno descritto la formazione di complessi ionici tra HA e insulina diminuendo le forze

ioniche e aumentando il pH della soluzione tramite dialisi. Gli autori hanno osservato la formazione di complessi stabili dopo ottimizzazione dei parametri di dialisi con una migliore attività biologica per una potenziale somministrazione orale.

1.1.3.3. Rivestimenti con HA

Il rivestimento di superfici con biomateriali come l'HA è stato abbondantemente descritto da Morra (2005). Sono stati riportati differenti metodi di rivestimento, includendo legami covalenti alle superfici, interazioni ioniche o adsorbimento. Per esempio, l'HA è stato covalentemente legato alla superficie degli stent metallici usando carbodiimidi (Verheye et al., 2000). Pitt et al. (2004) hanno descritto un altro metodo per legare l'HA al metallo tramite condensazione dei derivati HA-idrazide sulla superficie metallica funzionalizzata con gruppi aldeidici. Più recentemente, sistemi composti da film multistrato per superfici ingegnerizzate con biomateriali sono stati riportati (Crouzier, Boudou, & Picart, 2010). Schneider et al. (2007) hanno sintetizzato dei film layer-by-layer che contenevano HA nella forma nativa e HA modificato con ammine cationiche. Inizialmente l'HA nativo è stato convertito nella sua forma acida e dissolto in DMSO per reagire con una etilendiammina monoprotetta usando EDC e NHS. Il secondo gruppo amminico è stato deprotetto per ottenere

l'HA modificato con un'ammina cationica. I film multistrato sono stati poi formati usando la tecnica layer-by-layer descritta da Decher, Hong e Schmitt (1992). Richert et al. (2004) hanno precedentemente riportato il miglioramento dell'adesione cellulare e la resistenza di film reticolati a base di HA-poli(l-lisina). La rigidità dei film reticolati gioca un ruolo chiave nel miglioramento dell'adesione cellulare e tali film multistrato sono risultati promettenti per il rivestimento di impianti protesici.

1.1.4. Metodi chimico fisici per la caratterizzazione

1.1.4.1. Caratterizzazione della struttura

a. Spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR)

L' ^1H -NMR unidimensionale è il più comune strumento per caratterizzare i derivati dell'HA, come è mostrato negli studi iniziali di Pouyani e Prestwich (1994b) o Bulpitt e Aeschlimann (1999). Lo spettro NMR mostra la presenza dei composti coniugati e rende possibile calcolare il grado di modificazione di HA. Un tipico spettro di HA nativo solubilizzato in D_2O è mostrato in Figura 17a e presenta un ampio segnale dovuto all'alta viscosità della soluzione. Quando vien dissolto in D_2O contenente NaOH, la bassa viscosità della soluzione alcalina di HA porta ad un picco definito più chiaro (Figura 17b). L'ampio multipletto approssimativamente tra 3.2 e 3.9 ppm

corrisponde al segnale dei protoni degli anelli zuccherini. Essi sono tutti sovrapposti pertanto è difficile assegnare ogni protone individualmente. Il picco doppio a 4.5 ppm corrisponde ai due protoni anomericici attaccati ai carboni adiacenti ai due atomi di ossigeno. I protoni del CH₃ del gruppo n-acetilico di HA sono assegnati al picco ben definito a 1.95 ppm. Il segnale è leggermente ridotto a pH alcalino a 1.90 ppm. Questo picco è usualmente usato come riferimento per il calcolo del grado di modificazione poiché è raramente modificato quando si sintetizzano i nuovi derivati dell'HA.

La spettroscopia NMR è un metodo veramente utile per quantificare e caratterizzare la modificazione chimica. Per esempio, la L-alanina è stata legata sull'acido carbossilico dell'HA e lo spettro del coniugato purificato è mostrato in Figura 17c.

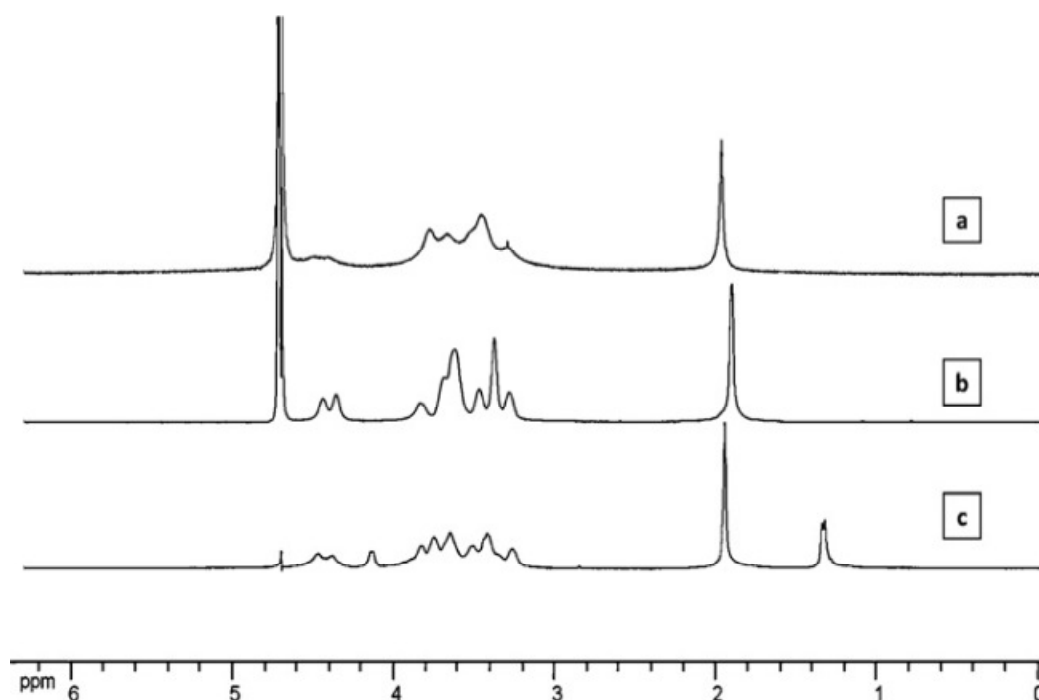


Figura 17 – Spettro ^1H NMR dell'acido ialuronico in D_2O (a), in D_2O con NaOH (b). Spettro ^1H NMR in D_2O di HA-alanina (c)

I nuovi picchi a 1.33 ppm e 4.14 ppm sono corrispondenti rispettivamente ai gruppi metilici e al $-\text{CH}$ dell'L-alanina. Il grado di sostituzione (DS) è facilmente determinabile calcolando il valore degli integrali del picco dei gruppi metilici dell'L-alanina (a 1.33 ppm) con i protoni metilici del gruppo N-acetilico dell'HA (a 1.9 ppm). Il picco del gruppo $-\text{CH}$ dell'L-alanina a 4.14 ppm può dare un'approssimazione del DS ma il picco è troppo ampio per dare un valore preciso. Il picco metilico dell'alanina ha il vantaggio di non essere sovrapposto ai picchi dell'HA nativo, permettendo un facile e preciso calcolo del grado di sostituzione.

Quando le molecole presentano segnali di legame che sono sovrapposti con i picchi dell'HA, è più difficile valutare il grado di sostituzione usando l' ^1H -NMR unidimensionale.

Eenschooten et al. (2010) hanno ottenuto risultati simili per i derivati anfifilici dell'HA usando DMSO- D_6 o D_2O , mostrando che ^1H -NMR è una tecnica affidabile anche per i composti anfifilici.

Comunque, Pravata et al. (2008) hanno trovato differenze negli spettri usando come solventi D_2O o $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$. Lo spettro NMR bidimensionale è stato presentato da diversi autori (Crescenzi, Francescangeli, Capitani, et al., 2003; Pravata et al., 2008; Sahoo, Chung, Khetan, & Burdick, 2008). Crescenzi et al. hanno usato per l'analisi, il *diffusion-ordered 2D NMR* (DOSY) con il quale è possibile differenziare le molecole legate ad HA da quelle non legate covalentemente (Crescenzi, Francescangeli, Capitani, et al., 2003). Queste tecniche consentono un'efficace verifica del processo di purificazione e sono state usate da Sahoo et al. (2008) per confermare il legame covalente dell'acido lattico-metacrilato sull'HA. Misure ^{13}C -NMR allo stato solido sono state eseguite su HA usando CP-MAS. De Nooy et al. hanno osservato che l'aumento del grado teorico di reticolazione porta all'aumento dell'intensità del segnale del carbonio coinvolto nella reticolazione. Per determinare questo tipo di

cambiamenti, come pure il grado di reticolazione, sono necessarie un alto numero di scansioni eseguite a frequenze molto alte (De Nooy et al., 2000). Diversi autori riportano l'uso di ^{13}C NMR in soluzione o allo stato solido come pure ^1H -NMR in due dimensioni e ^{13}C NMR (Follain et al., 2008; Magnani et al., 2000; Miřochova et al., 2006). L'NMR è senza dubbio un essenziale strumento per la caratterizzazione dei prodotti dell'HA. Tuttavia, un comune ^1H -NMR uni-dimensionale non fornisce le informazioni necessarie per un legame covalente e richiede una caratterizzazione ulteriore.

b. Spettroscopia infrarossa (IR)

Un'altra comune e complementare tecnica di caratterizzazione usata per l'HA è la spettroscopia infrarossa (IR), in particolare la spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier (FTIR) (Schneider et al., 2007; Young et al., 2004; Zhao, 2006). Essa permette di determinare il tipo di legame che si forma durante la modificazione dell'HA. Per esempio, Magnani et al. (2000) hanno osservato usando FTIR, la comparsa di bande del $\text{C}=\text{O}$ amidico a circa $1630-1640\text{cm}^{-1}$ che corrispondono ai nuovi legami ammidici formati tra le diammine e i gruppi carbossilici dell'HA. Allo stesso tempo, quando la quantità di reticolanti aumenta, l'intensità della banda del gruppo carbossilico a

circa $1720\text{-}1740\text{cm}^{-1}$ diminuisce. Miřochova et al. (2006) hanno confermato la presenza di catene alchiliche sull'HA mediante la comparsa di un picco osservato tra 2850 e 2930 cm^{-1} corrispondente ai moti vibrazionali dei gruppi -CH e -CH_2 . Tuttavia questo metodo non è adatto alla quantificazione del grado di modificazione. In alcuni casi, non possono essere ricavate informazioni dallo spettro FTIR, come osservato da Tomihata e Ikada, che non hanno ottenuto differenze tra lo spettro prima e dopo reticolazione, eccetto per una banda a 1650cm^{-1} che al passaggio dalla forma sale sodico dell'HA alla forma acida (Tomihata & Ikada, 1997a).

c. Quantificazione delle ammine primarie mediante saggio alla ninidrina

Kuo et al. (1991) hanno riportato un test colorimetrico che usa la ninidrina per quantificare i gruppi amminici primari liberi legati ad HA. I risultati negativi hanno confermato che non sono state legate ammine primarie all'HA tramite amidazione mediata da carbodiimmide. Inoltre questo rapido test è in grado di determinare se le ammine rilevate all'NMR sono legate covalentemente ad HA o se esse sono libere in soluzione.

1.1.4.2. Morfologia

a. Microscopia

La microscopia a scansione elettronica (SEM) è spesso usata per caratterizzare la morfologia dei derivati di HA allo stato secco (Esposito et al., 2005; Hwang et al., 2008; Luo, Kirker, et al., 2000; Luo, Ziebell, et al., 2000). Le immagini mostrano che l'HA nativo ha una struttura fibrosa e irregolare mentre HA-ADH ha una struttura altamente porosa e una superficie sheet-like (Pouyani, Harbison, & Prestwich, 1994). La SEM per le microsfeere o liposomi rivestiti, in particolare, è usata per caratterizzarne la forma, le proprietà superficiali o la distribuzione delle dimensioni. Per esempio, Esposito et al. (2005) hanno osservato microparticelle sferiche o microparticelle irregolari collassate il che dipende dai parametri usati per la loro formazione. La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) può essere utilizzata per determinare le caratteristiche superficiali di nanoparticelle essiccate (Bodnar et al., 2009; Hyung et al., 2008; Jeong et al., 2008; Yadav et al., 2007). Tuttavia le immagini ottenute non sono precise, anche se esse permettono il calcolo della dimensione delle particelle e della loro forma. Un altro metodo microscopico usato per i derivati di HA è la microscopia a forza atomica (AFM). A differenza delle due tecniche precedenti con questa

si possono ottenere informazioni sulla morfologia di sistemi contenenti HA in mezzo acquoso (Jederstrom et al., 2004; Schneider et al., 2007). Schneider et al. (2007) l'hanno usata per osservare la morfologia e la rugosità dei film multistrato reticolati di HA.

b. Dynamic light scattering

Misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS) forniscono informazioni sulle proprietà idrodinamiche delle microparticelle o nanoparticelle di HA in soluzione e forniscono anche il loro diametro e la distribuzione dimensionale (Bodnar et al., 2009; Hyung et al., 2008; Jederstrom et al., 2004; Jeong et al., 2008). Per esempio, Yadav et al. (2007) hanno osservato differenze nelle dimensioni e nella distribuzione delle dimensioni nelle nanoparticelle di HA-PLGA dipendente dai diversi parametri impiegati per il loro ottenimento.

1.1.4.3. Caratterizzazione fisica

a. Misure di rigonfiamento

La capacità di un idrogel di HA reticolato di trattenere acqua è misurata dalla sua proprietà di rigonfiamento (Jeon et al., 2007). Collins e Birkinshaw (2007) hanno usato le misure di rigonfiamento per comparare la densità di reticolazione degli idrogeli di HA formati con differenti agenti reticolanti. Alti valori di rigonfiamento sono

correlati ad una minore densità di reticolazione; maggiore è il grado di reticolazione dell'idrogel, più bassa è la sua capacità di assorbire acqua e più basso è il suo valore di rigonfiamento. In questo modo è stato dimostrato che la glutaraldeide e il divinil sulfone sono i più efficaci agenti reticolanti rispetto alle carbodimmidi e ai bisepossidi. Ghosh et al. (2005) hanno osservato che, come aspettato, il grado di rigonfiamento diminuisce quando la quantità di agente reticolante utilizzato, in questo caso poli (etilene glicole) di acrilato, è aumentata.

b. Test di compressione

Ibrahim, Kang, and Ramamurthi (2010) hanno eseguito un test di compressione uniassiale per determinare il grado di reticolazione apparente degli idrogeli di HA. I campioni sono stati compressi con una forza iniziale e con una velocità di compressione definiti. I risultati sono in accordo con i valori di rigonfiamento, dimostrando che aumentando la quantità di reticolante è diminuito il grado di reticolazione apparente. Collins and Birkinshaw (2008b) hanno effettuato un test di compressione per determinare anche il modulo di rigonfiamento, G_e , di HA reticolato con glutaraldeide.

c. Analisi termica

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è spesso eseguita per caratterizzare il comportamento termico dei derivati dell'HA o degli idrogeli di HA, ricavando informazioni sulle proprietà di idratazione (Collins & Birkinshaw, 2007, 2008b; Kafedjiiski et al., 2007; Luo, Kirker, et al., 2000; Luo, Ziebell, et al., 2000). Il termogramma del DSC dell'HA nativo è stato presentato da Luo et al e mostra un ampio picco endotermico a 89,5°C seguito da due sottili picchi esotermici a 243,6 e 258,7°C. Questi indicano la natura cristallina di HA (Luo, Kirker, et al., 2000; Luo, Ziebell, et al., 2000). I picchi oltre i 300°C corrispondono alla decomposizione dell'HA. I termogrammi di HA-ADH reticolati non mostrano più un picco esotermico, il materiale non è più cristallino ma amorfo. Gli studi di Barbucci, Rappuoli, Borzacchiello, e Ambrosio (2000) hanno fornito informazioni sull'idratazione dei derivati di HA, il picco endotermico attribuito alla disidratazione è più basso per l'HA nativo che per l'HA solfato, quest'ultimo quindi possiede un maggior contenuto di acqua. Infatti i gruppi solfato sono più polari dei gruppi ossidrilici dell'HA. Yadav et al. (2007) hanno chiarito che la temperatura di transizione vetrosa ha un significativo effetto sul rilascio del farmaco. Collins e Birkinshaw (2008b) hanno effettuato un'analisi termica meccanica e dinamica

(DMTA) per studiare l'influenza dei differenti agenti reticolanti e del contenuto di acqua sul modulo elastico (G'), sul modulo viscoso (G'') e sul fattore di smorzamento ($\tan \delta = G''/G'$) dei geli di HA reticolati.

d. Determinazione del peso molecolare

La cromatografia ad esclusione dimensionale insieme al multi-angle light scattering (SEC-MALS) è un metodo convenzionale per determinare il peso molecolare dei polimeri modificati. Preservare la lunghezza della catena dell'HA è un punto critico nella sintesi dei derivati dell'HA importante perché le sue proprietà di lubrificante, di assorbimento di essudati nelle ferite e riempimento degli spazi sono chiaramente correlate alla sua alta viscosità e peso molecolare. Una degradazione parziale è inevitabile durante i processi chimici di modificazione. Infatti l'HA è sensibile a varie procedure, specialmente la liofilizzazione e l'esposizione a condizioni alcaline (Tokita, Ohshima, & Okamoto, 1997). Questo tipo di analisi insieme alle rilevazioni del light scattering hanno il vantaggio di misurare il peso molecolare reale. I valori ottenuti non sono dipendenti da eventuali cambiamenti nelle sfere idrodinamiche in seguito a funzionalizzazione di HA e questo non porta a false interpretazioni. Il peso molecolare è calcolato usando l'incremento dell'indice di rifrazione specifico

(dn/dc) del polimero. I valori dn/dc dell'HA nativo sono usualmente compresi nel range 1.430-1.670 mL/g in dipendenza dal solvente e dai parametri di misurazione usati (Bergman et al., 2007; Hokputsa, Jumel, Alexander, & Harding, 2003; Mendichi, Schieron, Grassi, & Re, 1998). Un altro metodo riportato per misurare il peso molecolare dell'HA è il frazionamento asimmetrico flusso-campo-flusso (AFFFF). Maleki et al. (2007) hanno descritto questo metodo per lo studio della degradazione idrolitica dell'HA durante i processi di reticolazione con EDC. Esso è stato usato per misurare il peso molecolare e la distribuzione dei pesi molecolari a differenti tempi della reazione di reticolazione. Dopo un aumento iniziale, il peso molecolare ha mostrato una significativa diminuzione dopo sette giorni in presenza del reagente di reticolazione.

e. Misure reologiche

Come descritto nel paragrafo 1.1.1.1, le soluzioni di HA sono altamente viscosi e presentano un comportamento tipo *shear-thinning*, il che è dovuto all'alto peso molecolare di HA e alla formazione in soluzione di *entangled coil*. Studi reologici sono inoltre essenziali per valutare l'effetto della derivatizzazione o della reticolazione (Barbucci

et al., 2000; Borzacchiello et al., 2010; Huin-Amargier et al., 2006; Ibrahim et al., 2010; Maleki et al., 2007).

Le misurazioni possono essere effettuate in modalità di stress costante o in modalità oscillatoria. Una tipica curva di viscosità dinamica di una soluzione di HA in funzione dello stress applicato mostra una riduzione della viscosità all'aumentare della velocità della forza applicata, dimostrando la proprietà di shear-thinning dell'HA. L'HA modificato con basso peso molecolare ha una viscosità ridotta ma può ancora esibire proprietà *shear-thinning*. Huin-Amargier et al. (2006) hanno descritto la sintesi di polimeri associativi mediante il *grafting* di lunghe catene idrofobiche sull'HA. I polimeri anfifilici di questo tipo formano interazioni fisiche forti, le quali si rompono quando sottoposte ad alte forze di stress. Il comportamento shear-thinning è più marcato in questi idrogel che nell'HA nativo. Mediante esperimenti con stress oscillatorio su idrogel di HA reticolati è stato possibile determinare il modulo di forza elastico (G') e il modulo viscoso (G''), ottenendo informazioni sulle loro caratteristiche viscoelastiche. G' riflette l'elasticità del materiale mentre G'' rappresenta il suo comportamento viscoso. Barbucci et al. (2000) hanno presentato i risultati degli esperimenti di stress oscillatori sulle soluzioni di HA e sul gel reticolato. Per le soluzioni di HA non

modificato, G'' è più alto del modulo elastico G' ed entrambi aumentano in maniera lineare all'aumentare della frequenza. Questo comportamento è tipico per i liquidi viscosi. Per gli idrogel di HA il modulo elastico G' è più alto del G'' ed entrambi sono indipendenti dalla frequenza di oscillazione, questo comportamento è tipico dei solidi viscoelastici. Entrambi le forme di comportamento sono state anche dimostrate da Borzacchiello et al. (2010). In accordo a Barbucci et al. (2000), con queste misurazioni è possibile distinguere gli idrogeli chimici da reticoli aggrovigliati (idrogel fisici). La modalità di shear oscillatorio quindi fornisce importanti informazioni sulla natura degli idrogeli risultanti.

1.2. L'acido polilattico (PLA)

L'acido polilattico (PLA) è un polimero sintetico altamente versatile e biodegradabile il quale può essere preparato ad hoc per vari impieghi in campo farmaceutico e biomedico. Si tratta di un poliestere dell'acido lattico, ma essendo quest'ultimo una molecola chirale esistente in due isomeri L e D, il termine "acido poli-lattico" si riferisce ad una famiglia di polimeri: l'acido poli-L-lattico puro (PLLA), acido poli-D-lattico puro (PDLA) e acido poli-D,L-lattico (PDLLA) (Griffith, 2000) (Figura 18).

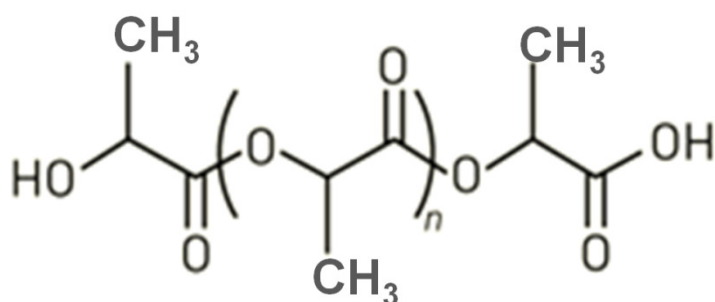


Figura 18 – Struttura dell'acido polilattico

L'isomero L dell'acido lattico è un metabolita biologico e il costituente maggiormente presente nel PLA derivato da fonti rinnovabili in quanto la maggior parte dell'acido lattico ottenuto da fonti biologiche esiste in questa forma.

Il PLA è stato ottenuto per la prima volta nel 1932 da Carothers (che in quel periodo lavorava alla DuPont) il quale ha preparato un prodotto a basso peso molecolare da un acido lattico riscaldato sotto vuoto. Nel 1954 la DuPont ha prodotto e brevettato un PLA ad alto peso molecolare.

Il PLA viene degradato principalmente per idrolisi che causa una diminuzione del peso molecolare. Comunque la degradazione di un poliestere, quale il PLA, è un processo lento: inizialmente si verifica l'idrolisi dei domini amorfi e soltanto in un secondo tempo, l'idrolisi dei domini cristallini che causa la completa degradazione del materiale (Andreopoulos et al., 2000). Sono stati condotti studi per valutare la

degradazione di impianti chirurgici costituiti da polilattide. Gli studi in vitro hanno dimostrato che il pH della soluzione in cui si trova il dispositivo gioca un ruolo chiave nella degradazione in vitro, e che, questi studi possono essere usati come modelli per prevedere la degradazione in vivo del PLA (Auras et al., 2004; Mainil-Varlet, 1997).

I primi polimeri a base di acido lattico sono stati commercializzati con successo come materiali per produrre fili per suture riassorbibili. Dopo questi sono stati sviluppati un gran numero di dispositivi protesici (Auras et al., 2004). Oggi le resine di PLA sono state approvate dall'*US Food and Drug Administration* (FDA) e dall'*European regulatory authorities* per applicazioni riguardanti il campo alimentare (pellicole e contenitori per alimenti) e alcune applicazioni chirurgiche, nonché come sistemi di rilascio di farmaci (Lampe et al., 2009).

L'acido polilattico possiede caratteristiche uniche di biodegradabilità, biocompatibilità, processabilità termoplastica e di eco-compatibilità e può essere potenzialmente impiegato come materia prima plastica, per imballaggi, per prodotti agricoli, per materiali usa e getta e per l'industria tessile e medica. L'impiego del PLA per la produzione di questi materiali non è motivato solo dalla sua biodegradabilità e dal fatto che si può ottenere da risorse rinnovabili, ma anche perché ha

dimostrato di funzionare molto bene e perché fornisce ad un costo contenuto eccellenti proprietà (Drumright et al., 2000). Il PLA può essere impiegato anche come singolo componente per diverse applicazioni semplicemente modificandone la struttura. In molti casi il polimero può essere miscelato o copolimerizzato con altri materiali polimerici o non polimerici per ottenere le caratteristiche desiderate (Cheng et al., 2009; Gupta et al., 2007).

Grazie alle sue caratteristiche il PLA è stato utilizzato come materiale per la costruzione di *scaffolds* adatti alla crescita di cellule per la ricostruzione tissutale (Gupta et al., 2007; Yamane and Sasai, 2003). In particolare scaffolds di PLA sono stati studiati per la ricostruzione del tessuto muscolare, osseo, e cartilagineo e per altri trattamenti riguardanti il campo ortopedico e neurologico (Coutu, et al., 2009; Kellomäki et al., 2000; Papenburg et al. 2009).

Il PLA opportunatamente modificato, è stato reso adatto anche, per la produzione di dispositivi di fissaggio come piastre riassorbibili e viti in campo ortopedico (Lorenz, 2010). Le fibre di PLLA invece grazie ai tempi di degradazione molto lunghi sono adatte per la ricostruzione di tendini e legamenti tramite impianti temporanei, riassorbibili o per la costruzione di *stents* per la chirurgia vascolare e urologica (Durselen et al. 2001).

Un altro possibile impiego di questo polimero riportato fin dal 1973, è la costruzione di matrici degradabili per il rilascio sostenuto di sostanze bioattive nel campo del *Drug Delivery* (Auras et al., 2004). In particolare il PLA è stato utilizzato per preparare delle microsfeere e microcapsule che hanno consentito un prolungato rilascio di una larga varietà di agenti attivi, quali ad esempio: anestetici locali, antagonisti dei narcotici e vaccini (Tan et al., 2010). Infine il PLA è stato anche utilizzato per costruire scaffolds utilizzati per la *gene therapy* per curare malattie cardiovascolari (Coutu et al., 2009).

1.3. Ciclodestrine

Le ciclodestrine (CD) sono molecole di sintesi isolate nel 1891 da Villiers, uno scienziato francese, quali prodotti di degradazione dell'amido e successivamente caratterizzate nel 1904 da Schardinger quali oligosaccaridi ciclici. Nel 1938 Freudenberg e colleghi ne identificarono la struttura chimica caratterizzata da unità di glucosio tenute insieme da legami glucosidici α 1 \rightarrow 4.

1.3.1. Struttura chimica e proprietà delle ciclodestrine

Le ciclodestrine vengono ottenute a partire dall'amido per azione di un enzima, la ciclomaltodestringlucano transferasi (CGTase) (Figura 19) ovvero un tipo di amilasi capace di staccare dall'elica glucosidica

dell'amido dei frammenti da 6 a 12 unità di glucosio, collegare le estremità, ottenendo dunque miscele di molecole cicliche costituite da anelli a 6,7 o 8 unità di D(+) glucosio, denominate rispettivamente α -, β - e γ -ciclodestrine.

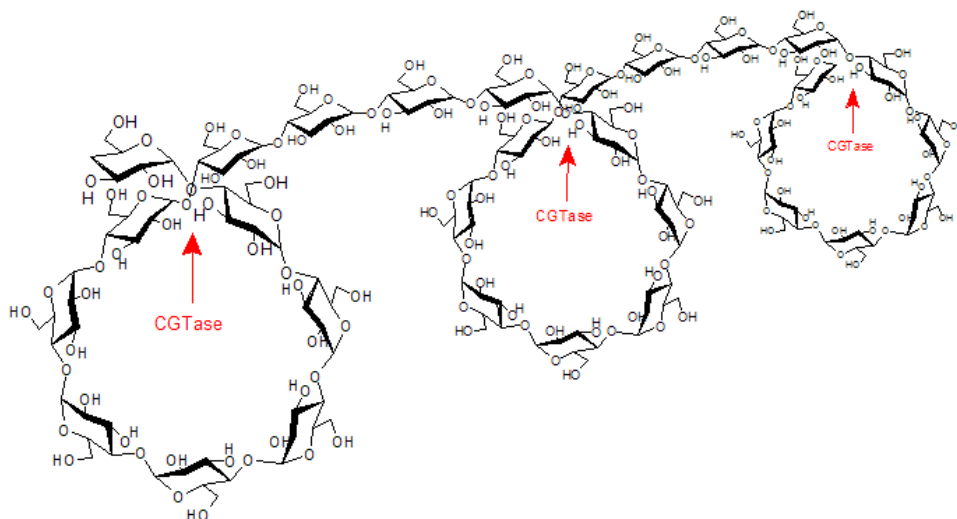


Figura 19 – Degradazione dell'amido da parte della CGTase per la formazione delle ciclodestrine

Le ciclodestrine possiedono una tipica struttura ad anello delimitante una cavità apolare all'interno della quale possono essere inglobate molecole idrofobiche per la formazione quindi di un complesso di inclusione; la superficie esterna invece possiede caratteristiche idrofile per la presenza di gruppi ossidrilici. La polarità della cavità è stata calcolata essere simile a quella di una soluzione etanolica acquosa. In soluzione acquosa i gruppi ossidrilici della superficie esterna tendono a formare legami ad idrogeno con le molecole d'acqua circostanti

formando un vero e proprio guscio di idratazione attorno alle molecole di ciclodestrine disciolte (Winkler R.G. et al.,2000).

La cavità apolare è leggermente conica, tanto che la molecola assume una struttura tronco conica (figura 20). I lati sono costituiti da un cerchio di sei o più esagoni, ognuno dei quali sta approssimativamente nel piano costituente i lati; la profondità del tronco di cono è così fornita dalla larghezza dell'anello piranosico. Esternamente al tronco di cono, attorno al margine superiore più largo, si trovano gli OH secondari del C-2 e del C-3, mentre attorno al margine inferiore più stretto si trova l'OH primario del C-6, ovvero i gruppi $-CH_2OH$. L'interno del tronco di cono è costituito da tre strati, uno sovrapposto all'altro: due strati di C-H e, in mezzo, uno strato di O glicosidici.

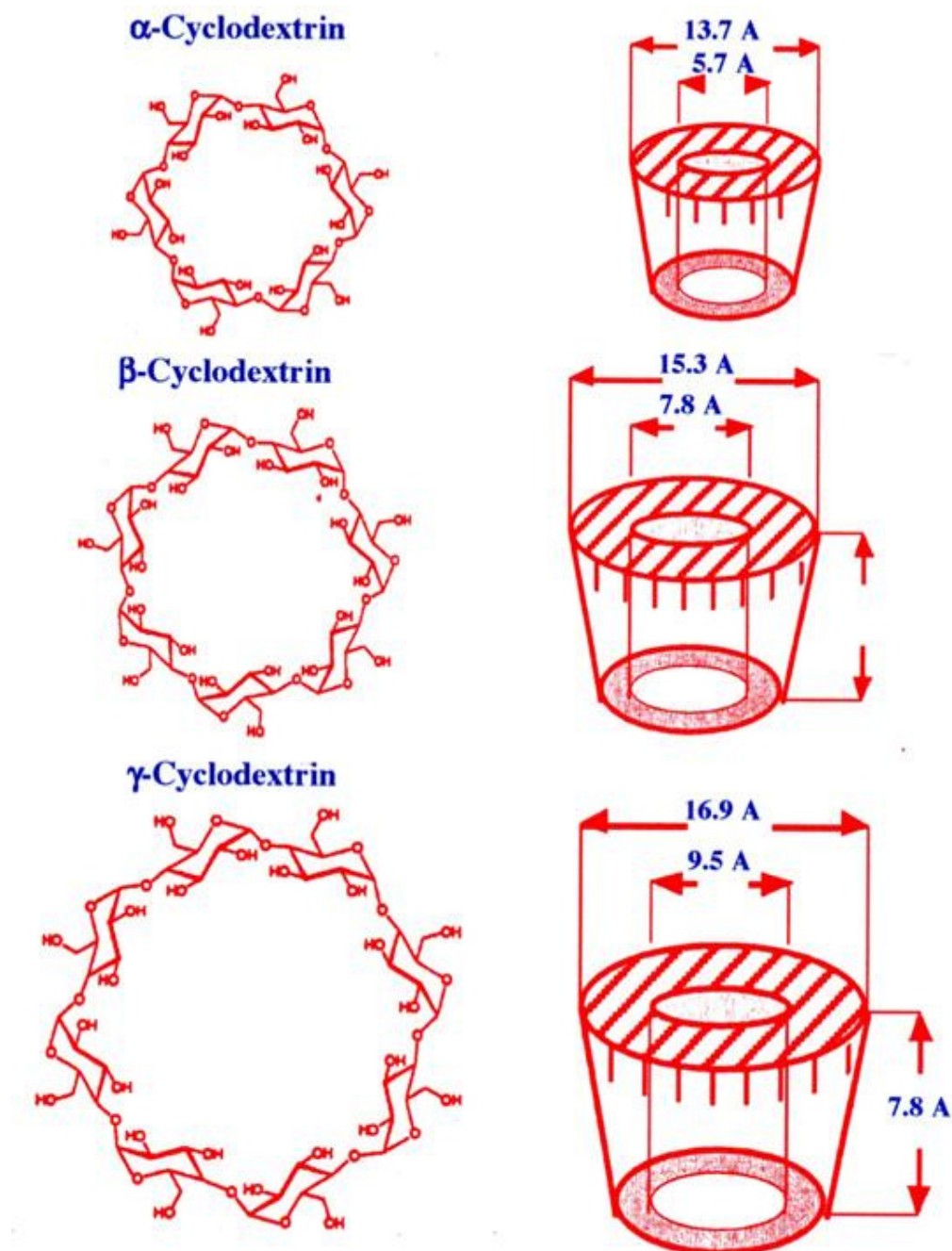


Figura 20 – Struttura delle ciclodestrine

Una ciclodestrina può fungere, al pari di un etere corona, da sito ospitante per le molecole. Ma essa, contrariamente ad un etere corona, ha una parte esterna apolare e idrofila e una parte interna lipofila

relativamente apolare. Questo conduce a due risultati: (a) nel suo interno lipofilo una ciclodestrina accetta solitamente, come ospite, non uno ione, ma una molecola organica apolare oppure la parte terminale apolare di una molecola organica; e (b) il suo esterno idrofilo rende solubile in acqua il complesso risultante. Il maggior o minor inserimento di una molecola ospitata dipende dalla sua dimensione e dalla sua polarità, e anche dalla dimensione del tipo di ciclodestrina utilizzata. La dimensione della cavità delimitata da ciascuna ciclodestrina è dell'ordine di qualche nanometro, ha valori differenti a seconda della ciclodestrina considerata, e come mostra la figura 19, è maggiore nel caso della γ -ciclodestrina.

La forma ad anello delle ciclodestrine è stabilizzata da legami ad idrogeno tra i gruppi ossidrilici secondari di due unità glucosidiche adiacenti, tali legami intramolecolari stabilizzano il ciclo ma contemporaneamente ne limitano la solubilità in acqua.

Come si può osservare dal grafico riportato in figura 21, le proprietà idrofiliche delle tre ciclodestrine sono dipendenti da alcuni parametri ed in particolar modo aumentano all'aumentare della temperatura.

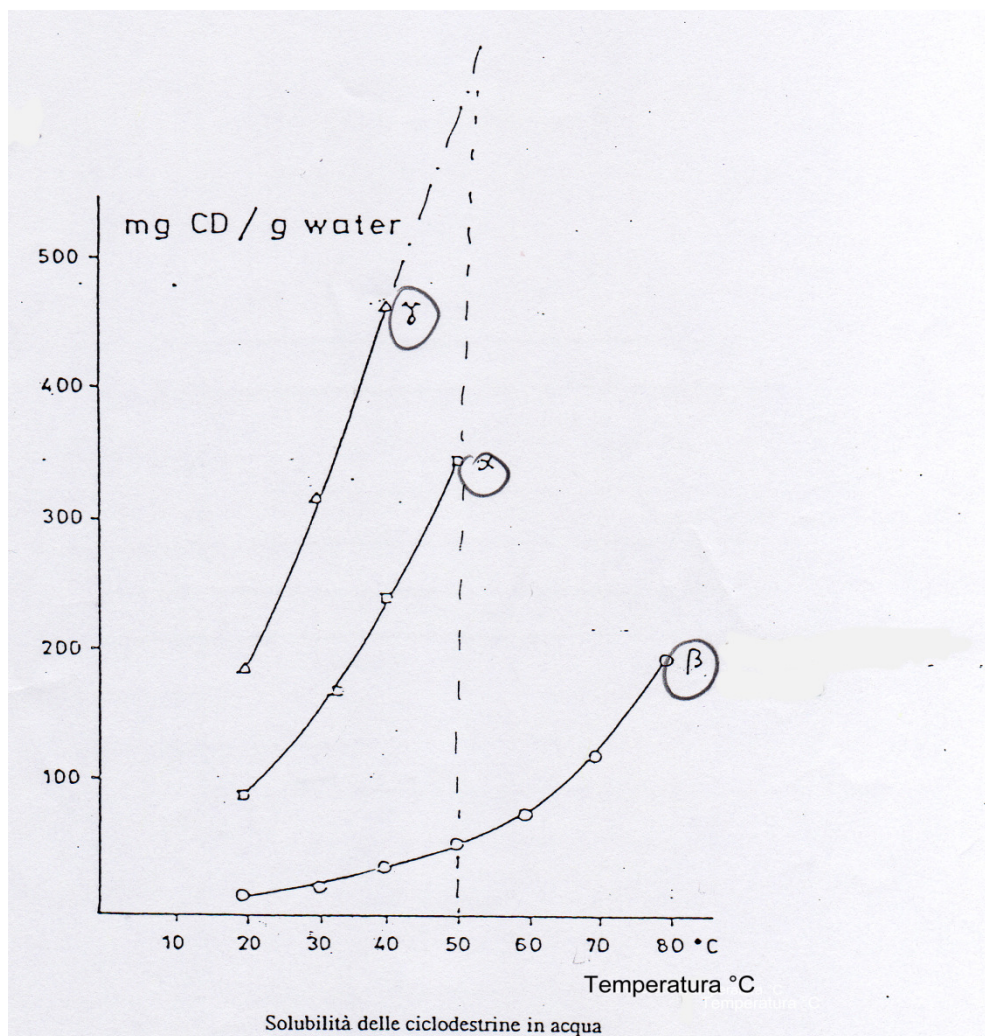


Figura 21 – Grafico della solubilità (mg CD/g acqua) delle ciclodestrine in acqua in funzione della temperatura

La β -ciclodestrina (Tabella 2) ha minore solubilità delle altre due, perché oltre a possedere legami ad idrogeno intramolecolari possiede anche legami ad idrogeno intermolecolari tra i gruppi ossidrilici secondari di due unità di ciclodestrina che si dispongono in un'orientazione testa-testa.

Tabella 2 – Dimensioni, peso molecolare e solubilità in acqua delle ciclo destrine

Type of CD	Cavity Diameter Å	Molecular Weight	Solubility (g/100 mL)
α -CD	4.7–5.3	972	14.5
β -CD	6.0–6.5	1135	1.85
γ -CD	7.5–8.3	1297	23.2
δ -CD	10.3–11.2	1459	8.19

Questo è un limite poiché significa che i complessi risultanti dall'interazione delle sostanze lipofile con tali CD potrebbero essere scarsamente solubili e causare precipitazione in acqua e in altri sistemi acquosi. Per tale motivo, allo scopo di aumentare solubilità della β -ciclodestrina in acqua, sono state effettuate delle modificazioni chimiche a carico dei gruppi ossidrilici tra cui la metilazione, l'idrossipropilazione e l'idrossietilazione.

L'introduzione dei gruppi metilici nella β -ciclodestrina, dà origine a due tipi di derivati che differiscono per il grado di sostituzione: la dimetil- β -ciclodestrina e la trimetil- β -ciclodestrina. Le strutture ottenute presentano maggiore solubilità in acqua e in solventi organici rispetto alla β -ciclodestrina non metilata.

Dal grado di sostituzione dipendono inoltre le caratteristiche chimico-fisiche e la capacità complessante, la quale aumenta al diminuire del grado di sostituzione.

Tra le modificazioni chimiche apportate alle ciclodestrine, ha destato particolare interesse l'introduzione, su uno o più gruppi ossidrilici del macrociclo di β -ciclodestrina, di unità di glucosio o di maltosio. Le *branched* β -ciclodestrine così ottenute posseggono elevata solubilità in acqua (da 97 a 150 g/100 ml) ed elevate capacità complessanti.

1.3.2. Capacità complessante delle ciclodestrine

La proprietà principale delle ciclodestrine è la capacità di formare complessi di inclusione con molecole idrofobiche ottenendo quindi un incremento della solubilità della molecola complessata. La forza motrice di tale complessazione è l'ottenimento di un sistema energeticamente più stabile. In soluzione acquosa le molecole di acqua circondano sia la superficie esterna delle ciclodestrine sia la cavità apolare instaurando in questo caso un'interazione polare-apolare non favorita termodinamicamente. Se in soluzione è presente una molecola idrofobica, essa spiazza le molecole d'acqua per un meccanismo di competizione nei confronti della cavità idrofobica, dando origine ad un'interazione apolare-apolare energeticamente favorita. Le molecole

d'acqua allontanate, si riorganizzano nel mezzo acquoso e contribuiscono alla stabilizzazione del sistema (Figura 22).

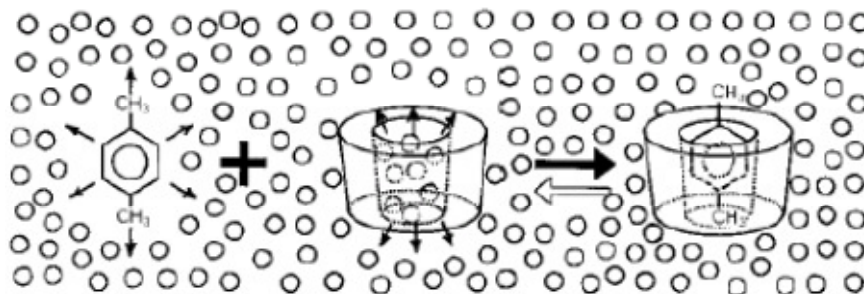


Figura 22 – Formazione del complesso di inclusione utilizzando ciclodestrine

Condizione necessaria per la formazione di un complesso di inclusione è la compatibilità tra l'ingombro molecolare e lo spazio disponibile all'interno della cavità. Da questo punto di vista la β -ciclodestrina, rispetto alle altre due ciclodestrine, possiede dimensioni ottimali per l'interazione. Nessun legame covalente è formato o rotto durante la formazione del complesso farmaco/ciclodestrina e in soluzione acquosa i complessi subiscono dissociazione; questo meccanismo spiega la reversibilità che caratterizza questi complessi. Le velocità di formazione e di dissociazione dei complessi farmaco/ciclodestrine sono molto rapide e tali complessi sono continuamente formati e rotti, questo consente di stabilire una data costante di associazione K (Stella V. et al.,1999) il cui valore è molto spesso compreso tra 50 e 2000 M^{-1} con un valore medio di 130, 490 e

350 M^{-1} rispettivamente per le α -CD, β -CD e γ -CD (Rao V.M. et al.,2003). I complessi di inclusione, in funzione delle dimensioni della molecola ospite, in base all'orientazione relativa delle unità di ciclodestrine e alla connessione tra cavità adiacenti, possono assumere allo stato solido tre tipi di strutture:, a gabbie, a strati o a canali.

1.3.3. Considerazioni tossicologiche

Possedendo una superficie esterna idrofila, le ciclodestrine non vengono assorbite nel tratto gastro-intestinale nella loro forma non modificata. Nel colon le ciclodestrine vengono metabolizzate a maltodestrine, maltosio e glucosio, che verranno ulteriormente degradati, assorbiti ed eliminati sottoforma di anidride carbonica ed acqua.

Le ciclodestrine modificate non vengono metabolizzate per motivi di ingombro sterico e dunque nella loro forma non modificata vengono eliminate tramite le feci.

L' α -ciclodestrina si può trovare nelle soluzioni parenterali e nelle formulazioni orali come le compresse. La somministrazione orale dell' α -CD è in genere, tollerata in misura migliore e non è associata a significativi effetti collaterali (Lina B.A.R. et al.,2004). Solo piccole frazioni dell' α -CD sono assorbite nel tratto gastrointestinale e vengono escrete non modificate nelle urine dopo iniezione endovena.

La β -ciclodestrina a causa della sua scarsa solubilità in acqua e nefrotossicità non può essere somministrata per via parenterale e poichè non è tossica se somministrata per via orale, si può trovare sul mercato in formulazioni orali e topiche, ma anche nelle formulazioni di farmaci per via buccale e rettale.

Il metabolismo della γ -ciclodestrina somiglia molto a quello degli amidi e delle destrine lineari; solo una piccola parte è assorbita intatta nel tratto gastro-intestinale ed espulsa in forma non modificata nelle urine dopo iniezione per endovena. Le CD idrofile, tra cui la 2-idrossipropil- β -ciclodestrina (HP β -CD) e la solfobutiletere- β -ciclodestrina sodica (SBE β -CD), sono considerate poco tossiche a dosi orali ed endovenose moderate (Irie T. et al.,1997; Thompson D.O.,1997). L' HP β -CD è ben tollerata negli uomini, il principale effetto collaterale consiste in un aumento dell'esigenza di defecazione e diarrea a dosaggi di 16-24 g di HP β -CD/al giorno per 14 giorni (Irie T. et al.,1997; Brewster M.E. et al.,2007). L'emivita dell'HP β -CD dopo iniezione per endovena è di circa 1.7 ore ed il suo volume apparente di distribuzione (V_d) è 0.2 l/Kg. Dopo l'iniezione endovenosa, HP β -CD è quasi totalmente eliminata dai reni tramite filtrazione glomerulare. Di conseguenza la sua somministrazione in pazienti con insufficienza renale deve essere accuratamente evitata.

Pochi riferimenti bibliografici sul profilo tossicologico della SBE β -CD sono disponibili, nonostante ciò essa si può trovare sul mercato in diversi prodotti, includendo la soluzione parenterale di voriconazolo (Vfend®), la quale viene o diluita due volte con soluzione salina prima della somministrazione per endovena. L'effetto emolitico delle CD sugli eritrociti umani in tampone fosfato è in ordine: β -CD metilate > β -CD > HP β -CD > α CD > γ CD > HP γ -CD > SBE β -CD (Irie T. et al.,1997; Thompson D.O.,1997).

1.3.4. Applicazioni farmaceutiche delle ciclodestrine

Il primo prodotto farmaceutico nel mondo contenente ciclodestrine è stata la prostaglandina E₂/BCD (Prostarmon ETM compressa sublinguale), che entrò nel mercato giapponese nel 1976.

A questo fece seguito nel 1988 l'entrata nel mercato europeo del primo prodotto farmaceutico contenente CD, il piroxicam/BCD (Brexin ® compresse), e nel 1997 venne introdotto il primo prodotto approvato dagli Stati Uniti, itraconazolo/2idrossipropil-BCD soluzione orale (Sporanox ®) (Uekama K. et al.,2006; Strickley R.G.,2004).

Nei diversi e numerosi preparati farmaceutici ad oggi nel mercato mondiale, le ciclodestrine hanno lo scopo principale di agire come agenti complessanti per aumentare la solubilità di farmaci scarsamente

solubili in acqua, incrementare la loro biodisponibilità e renderli maggiormente stabili (Avdeef A. et al.,2007).

Le ciclodestrine vengono inoltre utilizzate per ridurre o inibire l'irritazione sia a livello gastrointestinale che a livello oculare, ridurre odori e sapori sgradevoli, prevenire interazioni farmaco-farmaco e convertire farmaci liquidi oleosi in polveri microcristalline o amorfe (Uekama K.,1999) (figura 23).



Figura 23 – Principali effetti delle ciclodestrine in una forma di dosaggio

Le ciclodestrine possono essere usate anche per catalizzare reazioni organiche, spesso con regioselettività e con un certo grado di stereoselettività, e fatto ancor più importante, come semplici modelli attraverso cui studiare l'azione degli enzimi.

Gli effetti delle ciclodestrine sulle reazioni chimiche possono essere di tipo differente:

- possono semplicemente nascondere determinate porzioni delle molecola ospitata ed esporne altre;
- possono cambiare la conformazione della molecola ospitata;
- tramite la loro cavità lipofila forniscono un ambiente non polare per la molecola ospitata, ma in un solvente polare;
- tramite i loro gruppi –OH possono partecipare alla reazione: sia direttamente (come basi, nucleofili, o come siti contenenti legami ad idrogeno) o attraverso intermedi transitori (esteri, per esempio) che si formano dalla reazione con l'ospitante o con un particolare reattivo.

L'utilizzo peculiare delle ciclodestrine come modelli enzimatici proviene dal fatto che, come gli enzimi, esse per prima cosa si fissano al substrato e successivamente, tramite i gruppi sostituenti, agiscono su di esso.

2. SCOPO DELLA TESI

Una parte del presente lavoro di tesi di dottorato di ricerca ha riguardato la sintesi e caratterizzazione chimico-fisica di nuovi derivati polimerici a struttura polisaccaridica-polilattidica per la produzione di sistemi da impiegare nel campo del *drug delivery*, in particolar modo in ambito ortopedico.

Nel 5 - 33% di casi di fratture ossee si sviluppano infezioni acute o osteomieliti croniche. Nelle situazioni in cui un corpo estraneo inerte (come una protesi) viene impiantato in un tessuto che è già ferito e indebolito, si sviluppa una competizione, per la colonizzazione della superficie dell'impianto, tra i batteri (come *Staphylococcus aureus*, che è stato ritrovato spesso nei casi di fratture ossee contaminate) e le cellule del sistema immunitario. I batteri però hanno dei vantaggi rispetto alle cellule del sistema immunitario, che consistono nella rapidità dei processi riproduttivi e nell'estrema flessibilità ad adattarsi all'ambiente in cui si trovano. Ciò provoca la formazione del *fouling*, definito come il film di organismi cellulari o batteri che ricoprono una superficie immersa in un particolare ambiente. Nel caso di dispositivi biomedici (come per esempio protesi) il *fouling* può degenerare nella colonizzazione batterica quindi in infezioni e degradazione dei materiali con gravi conseguenze sui pazienti. Gli approcci usati contro

la colonizzazione batterica sono diversi a seconda dei casi: per le protesi è necessario procedere alla sterilizzazione e conservazione sterile fino al momento dell'impianto. Durante l'uso si cerca di ridurre le occasioni di contatto del materiale con i batteri tramite disinfezione del locale, il ricorso a terapie antibiotiche sistemiche e mediante l'uso di materiali che possano comunque risultare non *fouling*. Tuttavia la somministrazione parenterale di antibiotici comporta alcuni inconvenienti come la tossicità sistemica, un ridotto assorbimento nei tessuti ischemici o necrotici ed una ospedalizzazione prolungata per monitorare i livelli di farmaco e i suoi effetti.

Recentemente la terapia antibiotica locale è divenuta un'accettata e comune alternativa alle terapie antibiotiche sistemiche, per la profilassi e la prevenzione di infezioni batteriche derivate da interventi chirurgici dove vengono impiegate protesi ortopediche. La terapia antibiotica locale offre svariati vantaggi rispetto alla terapia sistemica, tra i quali: un'alta concentrazione di principio attivo solo sul sito d'infezione che annulla la tossicità sistemica; una più completa eradicazione dell'infezione; l'impiego di piccole dosi di farmaco che non procurano effetti tossici.

Per i motivi finora detti, un rivestimento antibatterico con proprietà non fouling della protesi ortopedica che dovrà essere impiantata e che

comincia a rilasciare il principio attivo subito dopo l'applicazione rappresenta una valida possibilità per evitare la colonizzazione batterica sulla superficie dell'impianto, che comporterebbe un nuovo intervento per sostituire la protesi, un allungamento del periodo di ospedalizzazione e disagi ulteriori per il paziente. Vari veicoli per il rilascio locale di farmaci sono stati sviluppati e utilizzati. Impianti biodegradabili offrono i vantaggi del bioriassorbimento che evita il successivo intervento per la rimozione del materiale, riduce le reazioni da corpi estranei e aumenta il rilascio totale localizzato di antibiotico, infine la cinetica di rilascio del farmaco dalla matrice può essere modulata controllando i processi di degradazione della matrice stessa. Come già accennato nell'introduzione, l'acido ialuronico possiede proprietà non-fouling, ha un'ottima biodegradabilità e biocompatibilità ed è utilizzato già da diverso tempo in campo clinico. L'acido polilattico è stato approvato da FDA ed è largamente usato per impianti biodegradabili e biocompatibili utilizzati per applicazioni ortopediche come sistemi di rilascio di farmaci (Laurencin C. et al., 1994), inoltre essendo idrofobico è capace di conferire una opportuna lipofilia ad una matrice o un idrogel (per esempio a base di acido ialuronico), rallentandone l'idrolisi e prolungando di conseguenza il periodo di rilascio del principio attivo.

Per tali motivi, lo scopo di questa parte della tesi di dottorato di ricerca ha riguardato la produzione di idrogeli costituiti da acido ialuronico (HA) coniugato chimicamente all'acido polilattico (PLA) da utilizzare come veicoli per il rilascio locale di due antibiotici modello: la vancomicina e la tobramicina. Tali farmaci sono stati scelti in quanto hanno mostrato un'alta attività antibatterica contro *Staphylococcus aureus* e *Staphylococci* meticillina resistenti, spesso riscontrati in casi di fratture ossee contaminate. Analogamente sono stati preparati idrogeli a base di acido ialuronico coniugato sia all'acido polilattico che a catene poliossietileniche, al fine di valutare se la presenza di catene di PEG influenza le proprietà di rilascio degli idrogeli utilizzati in entrambi i casi per rivestire protesi ortopediche in titanio.

Oltre agli idrogeli di HA-PLA e PEG-HA-PLA nel presente lavoro di tesi di dottorato di ricerca, ci si è occupati della sintesi e caratterizzazione di derivati di acido ialuronico-ciclodestrina (HA-CDs). Come già riportato nell'introduzione, le CDs sono state utilizzate con successo come carrier per migliorare ed incrementare la solubilità, la stabilità chimica, la velocità di dissoluzione e la biodisponibilità di farmaci lipofili e per ridurre i loro effetti collaterali (Loftsson T.,1995; Loftsson T. et al.,1996; Szejtli J., 1998).

Parallelamente coniugati polimerici contenenti CDs sono stati sviluppati in modo da combinare le proprietà vantaggiose delle CDs con il particolare profilo farmacocinetico di alcuni polimeri (Auzely-Velty R. et al.,2001; Jimenez V. et al.,2003). Per esempio, è stata riportata in letteratura la sintesi dei chitosani legati alle β -ciclodestrine (Jimenez V. et al.,2003). Sono stati preparati coniugati poli (ϵ -lisina)- β -CD, e sono state inoltre dimostrate le loro funzionalità versatili in risposta a numerosi stimoli di diversa natura (Choi H.S. et al.,2003). Altri autori hanno preparato dendrimeri di poliamidoamina coniugati con CDs dimostrando la capacità delle CDs di aumentare la permeabilità cellulare e di promuovere la transfezione genica (Arima H. et al.,2001; Kihara F. et al.,2002). Polimeri contenenti CD potrebbero essere utilizzati, oltre che come carrier di farmaci (Auzely-Velty R. et al.,2001; Jimenez V. et al.,2003), anche come efficienti supporti per le separazioni chirali (Varma A.J et al.,2004), agenti in grado di rimuovere composti indesiderati dal cibo (Asanuma H. et al.,1997) o da soluzioni inquinate (Nishiki M. et al.,2000; Regan F. et al.,2003; Crini G.,2005; Aoki N. et al.,2003).

Tenendo in considerazione le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche sia delle CD che dell'acido ialuronico, l'obiettivo della seconda parte della presente tesi di dottorato di ricerca è stato, la

sintesi di un nuovo derivato ottenuto dalla reazione tra la β -CD e l'HA, entrambi opportunamente funzionalizzati, al fine di ottenere un nuovo materiale potenzialmente in grado di formare geli che, grazie alla presenza delle ciclodestrine, siano in grado di veicolare farmaci lipofili.

3.1.14. Conclusioni

La derivatizzazione chimica dell'acido ialuronico (HA) con acido polilattico (PLA) porta alla formazione di copolimeri siglati HA-g-PLA che a contatto con un mezzo acquoso (soluzione fisiologica pH 7.4) danno origine a idrogel con promettenti applicazioni in campo ortopedico. Tali idrogel infatti si preparano facilmente per semplice aggiunta dei copolimeri HA-g-PLA in soluzione fisiologica, risultano essere trasparenti, facilmente spalmabili su una superficie (per esempio una protesi in titanio) ed hanno la capacità di incorporare e rilasciare in maniera protratta farmaci in essi incorporati. In particolare sono stati preparati idrogel contenenti HA-g-PLA a diversa concentrazione (range 2-10 % p/v) e ne è stata testata la capacità di incorporare e rilasciare due antibiotici utilizzati nella profilassi in chirurgia ortopedica, quale la vancomicina e la tobramicina. Soluzioni acquose a diversa concentrazione di farmaco (range 1-2% p/v) vengono aggiunte all'idrogel e in pochi minuti si verifica la diffusione del principio attivo all'interno della massa gelatinosa, con la formazione di un idrogel "medicato". Tale campione è stato spalmato sulla superficie di protesi in titanio, quindi sono stati condotti studi in vitro per valutare la capacità dell'idrogel di rilasciare ciascun farmaco in soluzione fisiologica (pH 7.4). I risultati ottenuti hanno dimostrato

che gli idrogel a base di HA-g-PLA sono in grado di rilasciare tali antibiotici in maniera prolungata nel tempo, fino ad un massimo di 72 ore. Il profilo di rilascio del farmaco può essere modulato scegliendo l'opportuna concentrazione di HA-g-PLA e di antibiotico presente nell'idrogel. Inoltre, un rallentamento del rilascio si verifica se l'idrogel a base di HA-g-PLA viene preparato in presenza di una opportuna quantità di NaOH. In tal modo è possibile consentire una interazione elettrostatica tra l'acido ialuronico presente nell'idrogel e il farmaco (nel caso della vancomicina) che determina una riduzione della velocità di rilascio del farmaco.

In ogni caso, tutti gli idrogel a base di HA-g-PLA sono in grado di rilasciare un'opportuna quantità di farmaco già dalle prime ore successive al caricamento dell'idrogel sulla protesi. Questo risultato si rivela molto importante in quanto un buon burst effect iniziale potrebbe assicurare un'efficiente azione del farmaco già nelle prime ore successive all'impianto della protesi durante le quali risulta più probabile l'instaurarsi di un'infezione batterica. Inoltre, durante l'intero periodo di rilascio del farmaco, la concentrazione di antibiotico rilasciata dall'idrogel risulta essere sempre superiore al valore della minima concentrazione inibente (MIC) e ciò ovviamente

assicurerebbe l'efficacia del farmaco rilasciato in prossimità della protesi.

Ottimi risultati sono stati anche raggiunti utilizzando idrogel preparati a partire da copolimeri ottenuti dalla derivatizzazione chimica di HA-g-PLA con catene poliossitetileniche (PEG) e siglati come PEG-g-HA-g-PLA. Idrogel a base di PEG-g-HA-g-PLA risultano essere trasparenti, abbastanza viscosi e anch'essi dotati di una buona spalmabilità. La presenza di catene di PEG conferisce una opportuna idrofilia all'idrogel che riesce a consentire un ottimale rilascio del farmaco, anche senza l'aggiunta di NaOH.

I risultati ottenuti da tali studi rivelano che gli idrogel a base di HA-g-PLA e PEG-g-HA-g-PLA risultano avere ottimi requisiti per potere essere impiegati in campo ortopedico.

In particolare, tali idrogel risultano essere costituiti da polimeri biocompatibili, naturali quali acido ialuronico o sintetici quali acido polilattico e politetilenglicole, entrambi approvati dalla FDA. La preparazione degli idrogel avviene facilmente per semplice aggiunta del copolimero HA-g-PLA o PEG-g-HA-g-PLA ad una soluzione fisiologica, senza l'impiego di reagenti o solventi tossici.

Altrettanto rapido e semplice risulta essere l'incorporazione dei farmaci all'interno dell'idrogel per l'ottenimento di idrogel "medicati"

trasparenti e facilmente spalmabili sulla superfici di protesi ortopediche.

Inoltre è stato dimostrato che il copolimero HA-g-PLA può essere sottoposto a processi di autoclavatura al fine di sterilizzare il prodotto per un impiego clinico senza incidere significativamente sulle caratteristiche reologiche dell'idrogel nonché sulle sue proprietà di rilascio.

Dalle prove di simulazione di un impianto di una protesi su un femore isolato si è inoltre visto che il gel presenta delle appropriate proprietà adesive sia nei confronti della protesi stessa da impiantare sia nei confronti del tessuto intorno alla cavità femorale, nonostante sia sottoposto a notevoli sforzi di taglio, assicurando la presenza degli eventuali farmaci caricati sull'intero sito d'impianto.

Infine i soddisfacenti profili di rilascio ottenuti in vitro suggeriscono il potenziale impiego di tali sistemi per prevenire le infezioni batteriche dovute all'impianto di protesi ortopediche.

Ringraziamenti

Si ringrazia la NOVAGENIT S.R.L. per aver fornito l'acido ialuronico e i due antibiotici vancomicina e tobramicina, impiegati in questo lavoro di tesi.

3.2. Sintesi e caratterizzazione di un nuovo derivato acido ialuronico- β ciclodestrina

Tale derivato viene ottenuto dalla reazione tra la β CD e l'acido ialuronico, entrambi opportunamente funzionalizzati, come di seguito riportato.

3.2.1. Sintesi e caratterizzazione del derivato butirraldeidico dell'acido ialuronico (forma acetale)

La sintesi del derivato butirraldeidico dell'acido ialuronico (forma acetale) è stata eseguita partendo da HA-TBA solubilizzato in NMP anidro. Alla soluzione ottenuta è stato aggiunto CDI solido secondo il rapporto molare :

$$X = \frac{\text{moli di CDI}}{\text{moli di unità ripetitive di HA-TBA}} = 0.18$$

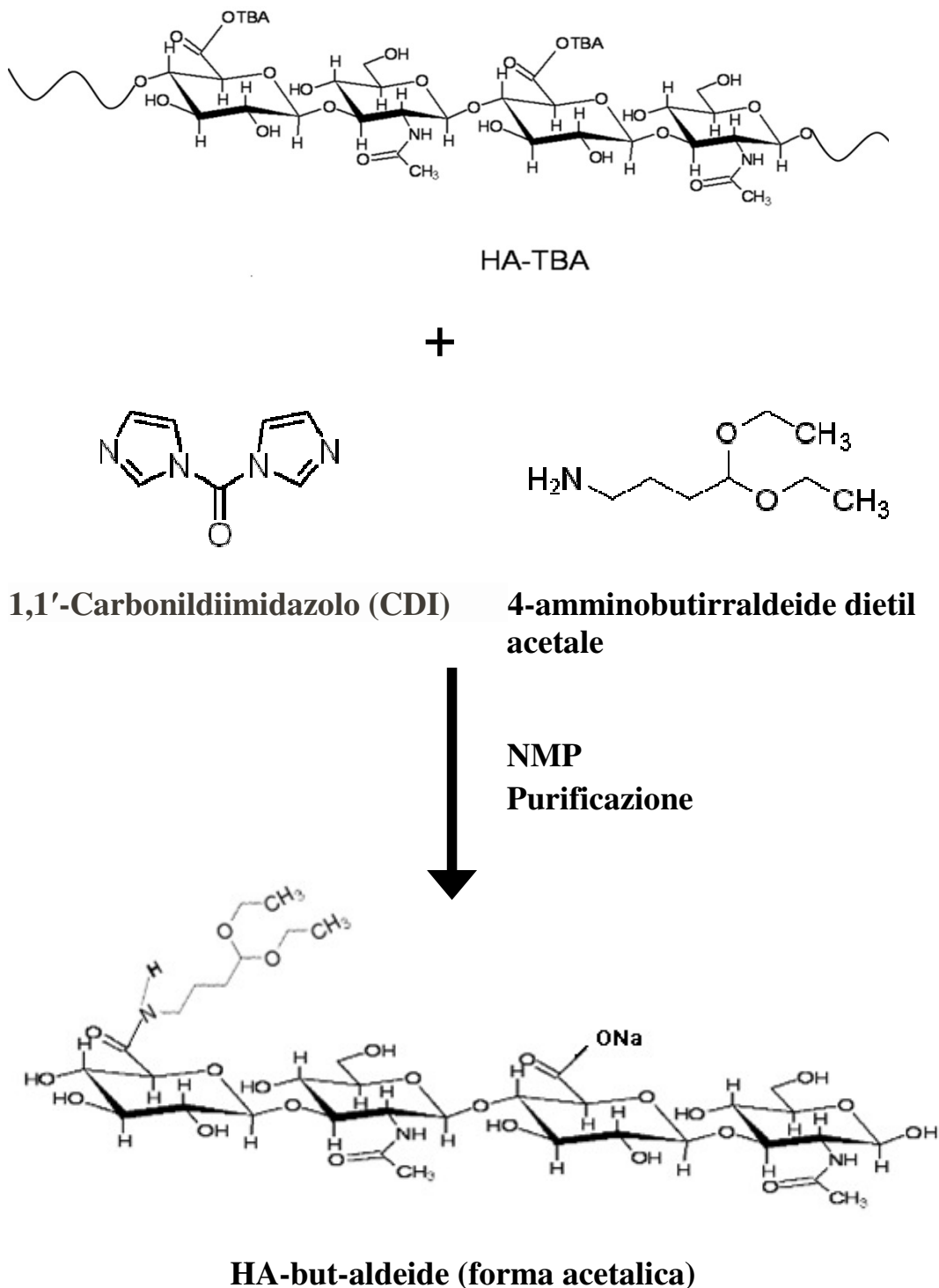
Alla miscela di reazione sono stati poi aggiunti acido metansolfonico e 4-amminobutirraldeide dietil acetale secondo un rapporto molare :

$$Y = \frac{\text{moli 4-amminobutirraldeide dietil acetale}}{\text{moli di unità ripetitive di HA-TBA}} = 0.19$$

La reazione è stata condotta a 40°C per 28 ore. Il prodotto ottenuto è stato purificato mediante lavaggi in etanolo e acetone, quindi

recuperato dopo centrifugazione ed essiccamento sotto vuoto.

Lo schema di reazione è di seguito riportato (Schema 4).



SCHEMA 4 – Schema di sintesi del derivato butirraldeidico dell'HA (forma acetlica)

Il prodotto così ottenuto è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$, FT-IR e UV. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O (Figura 28) ha mostrato i seguenti segnali: un ampio multipletto approssimativamente tra 3.2 e 3.9 δ che corrisponde al segnale dei protoni degli anelli zuccherini, ma essendo tutti sovrapposti è difficile assegnare ogni protone individualmente; un picco a 4.487 δ corrispondente ai due protoni anomericici legati al carbonio 1 di entrambi gli anelli presenti nell'unità ripetitiva dell'HA; i protoni del CH_3 del gruppo n-acetilico dell' HA sono assegnati al picco ben definito a 1.998 δ ed infine un picco relativo ai protoni dei 2($-\text{CH}_3$) appartenenti ai gruppi acetalici dell'aldeide a 1.155 δ .

Il grado di derivatizzazione (DD) molare percentuale in aldeide è stato determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ in D_2O e calcolato come segue:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{ moli di 4-amminobutirraldeide dietil acetale})}{(\text{n}^\circ \text{ moli di unità ripetitive di HA-TBA})} \times 100$$

comparando l'integrale del picco relativo ai protoni che sono attribuibili ai 2($-\text{CH}_3$) appartenenti ai gruppi acetalici dell'aldeide (1.155 δ) con l'integrale del picco attribuito ai protoni del ($-\text{CH}_3$), appartenenti all' HA (1.998 δ) ed è risultato pari al $14.75 \pm 2\%$ in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di HA.

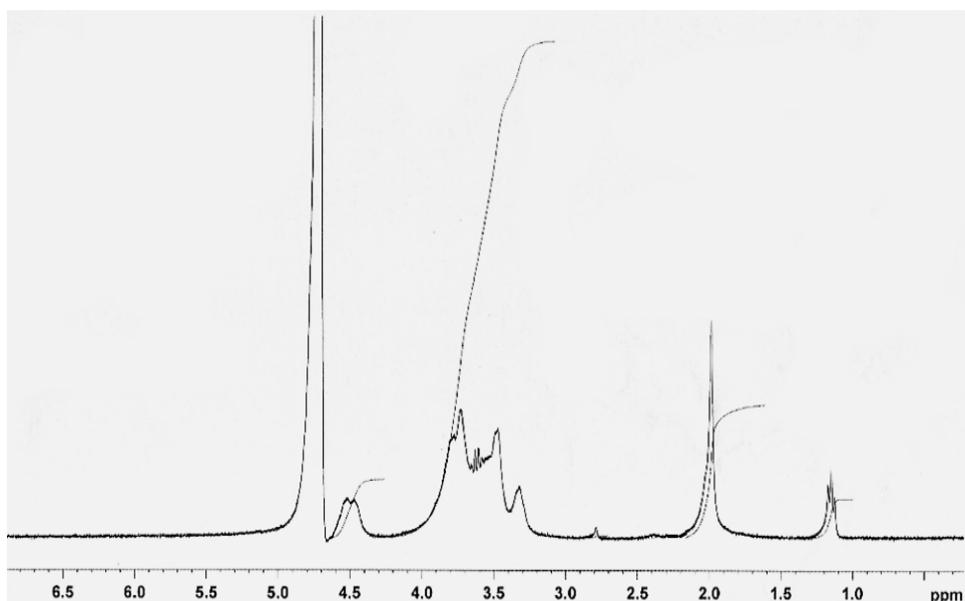


FIGURA 28 – Spettro ^1H -NMR (in D_2O) del derivato butirraldeidico dell'HA (forma acetaleica)

Lo spettro FT-IR del derivato butirraldeidico dell'HA (forma acetaleica) è riportato in figura 29, in cui è possibile osservare la presenza di: una banda larga a 3430.08 cm^{-1} (OH stretching ed NH stretching), una banda a 1653.85 cm^{-1} (stretching amide primaria), una banda a 1411.95 cm^{-1} (COO^- stretching), ed una banda a 1155.24 cm^{-1} (C-O stretching).

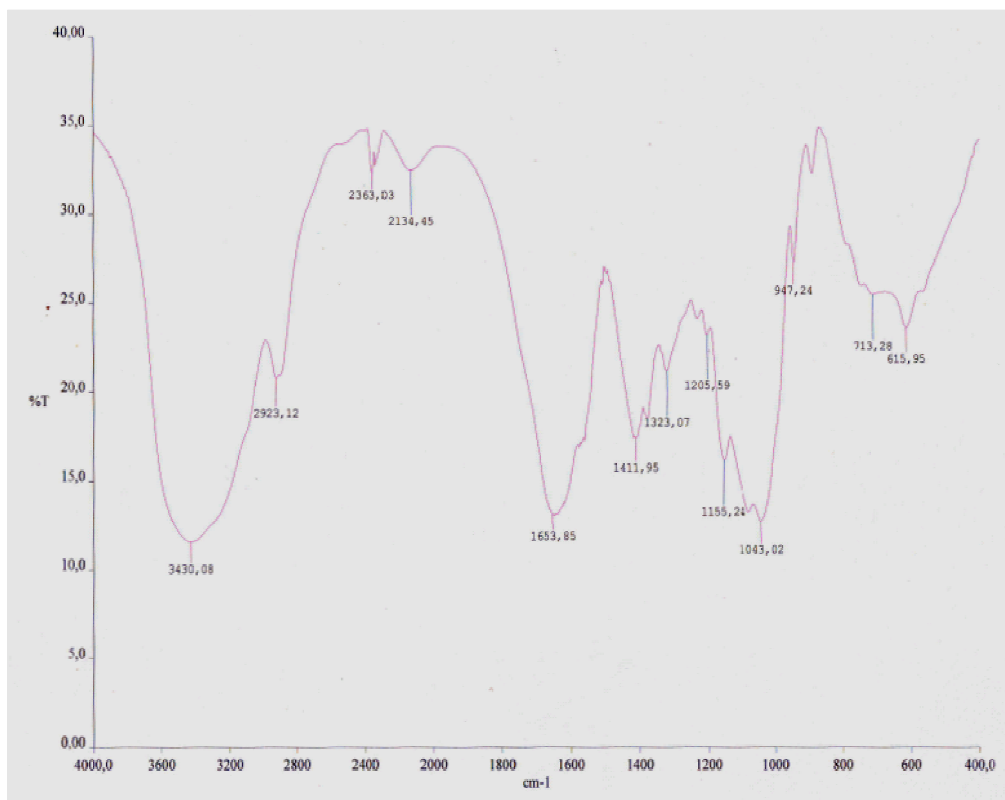


FIGURA 29 – Spettro FT-IR del derivato butirraldeidico dell’HA (forma acetaleica)

Dall’analisi UV è stato ottenuto tale spettro di assorbimento (Figura 30) dal quale non si osserva alcun massimo relativo al prodotto.

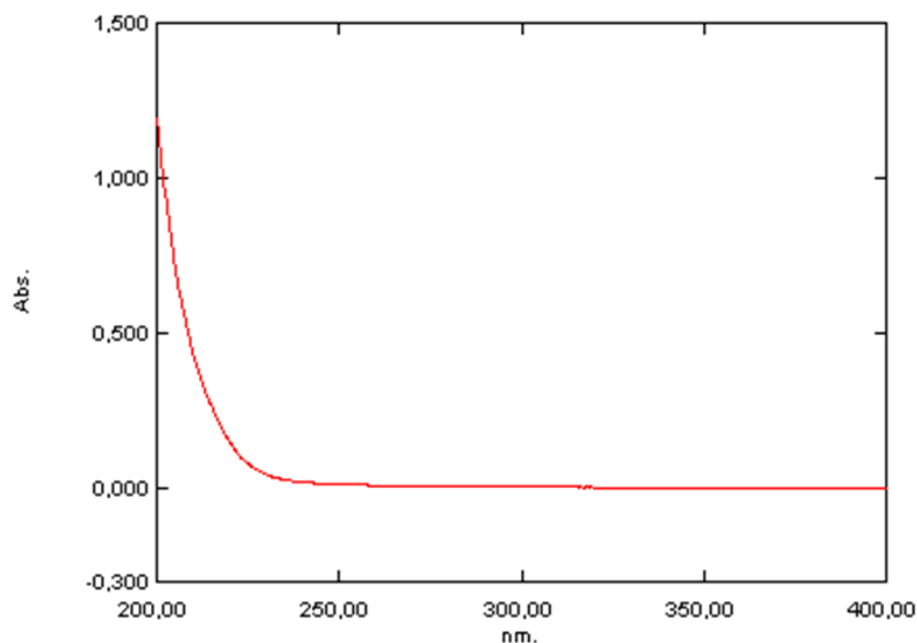
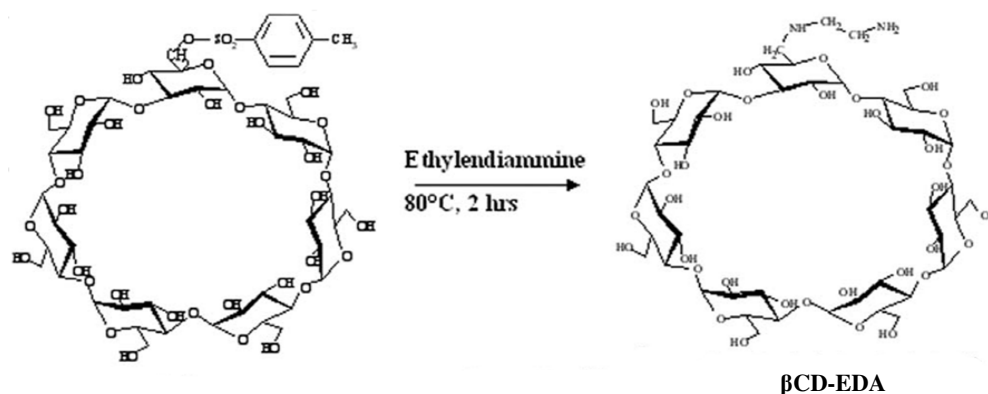


FIGURA 30 – Spettro UV del derivato butirraldeidico dell'HA (forma acetaleica)

3.2.2. Sintesi e caratterizzazione del derivato etilendiamminico della β ciclodestrina (β CD-EDA)

La sintesi di β CD-EDA è stata eseguita come riportato in letteratura (G. Giammona et al., 2006). Una soluzione di 6-O-monotosil- β -ciclodestrina in etilendiammina (EDA) è stata posta ad una temperatura di 80°C per due ore. La miscela di reazione è stata poi aggiunta goccia a goccia a 50 ml di acetone freddo ed il precipitato ottenuto è stato lavato con acetone, quindi centrifugato ed essiccato sottovuoto. Il prodotto finale è stato ottenuto con una resa in peso rispetto al prodotto di partenza pari all' 85 % p/p.

Lo schema di reazione viene di seguito riportato (Schema 5).



6-O-monotosil- β -ciclodestrina

SCHEMA 5 – Schema di sintesi del derivato etilendiamminico della betaciclodestrina (β CD-EDA)

Il prodotto così ottenuto è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$, FT-IR e UV. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O (Figura 31) ha mostrato i seguenti segnali: 2.582–2.704 δ (m, 4H, $\text{NH}_2\text{--CH}_2\text{CH}_2\text{--NH--}$); 3.495 δ (m, 14H, C2–H, C4–H); 3.739 δ (m, 28H, C3–H, C5–H, C6–H); 4.947 δ (s, 7H, C1–H) ed ha confermato l'avvenuta funzionalizzazione della β -CD con l'EDA, come verificato dal rapporto tra l'integrale del picco relativo ai protoni a 2.582–2.704 δ attribuiti ai $-(\text{NH--CH}_2\text{--CH}_2\text{--NH}_2)$, appartenenti all'EDA e l'integrale del picco a 4.947 δ relativo ai protoni del carbonio 1 delle unità di glucosio della β CD.

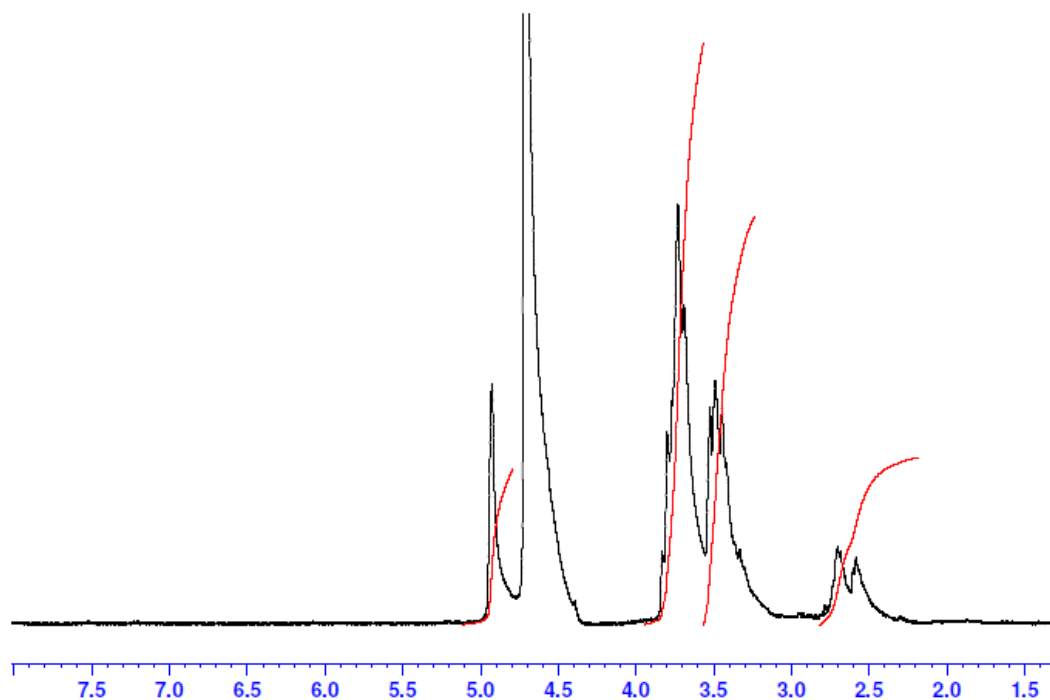


FIGURA 31 – Spettro ^1H -NMR (in D_2O) del derivato etilendiamminico della betaciclodestrina.

Lo spettro FT-IR del derivato etilendiamminico della betaciclodestrina è riportato in figura 32, in cui è possibile osservare la presenza di: una banda a 3395.75 cm^{-1} (OH e NH stretching), una banda a 1656.93 cm^{-1} (NH bending), bande a $1439.18\text{--}1300.69\text{ cm}^{-1}$ (C–H and OH bending), ed infine bande a 1158.22 cm^{-1} e 1029.26 cm^{-1} (C–O stretching).

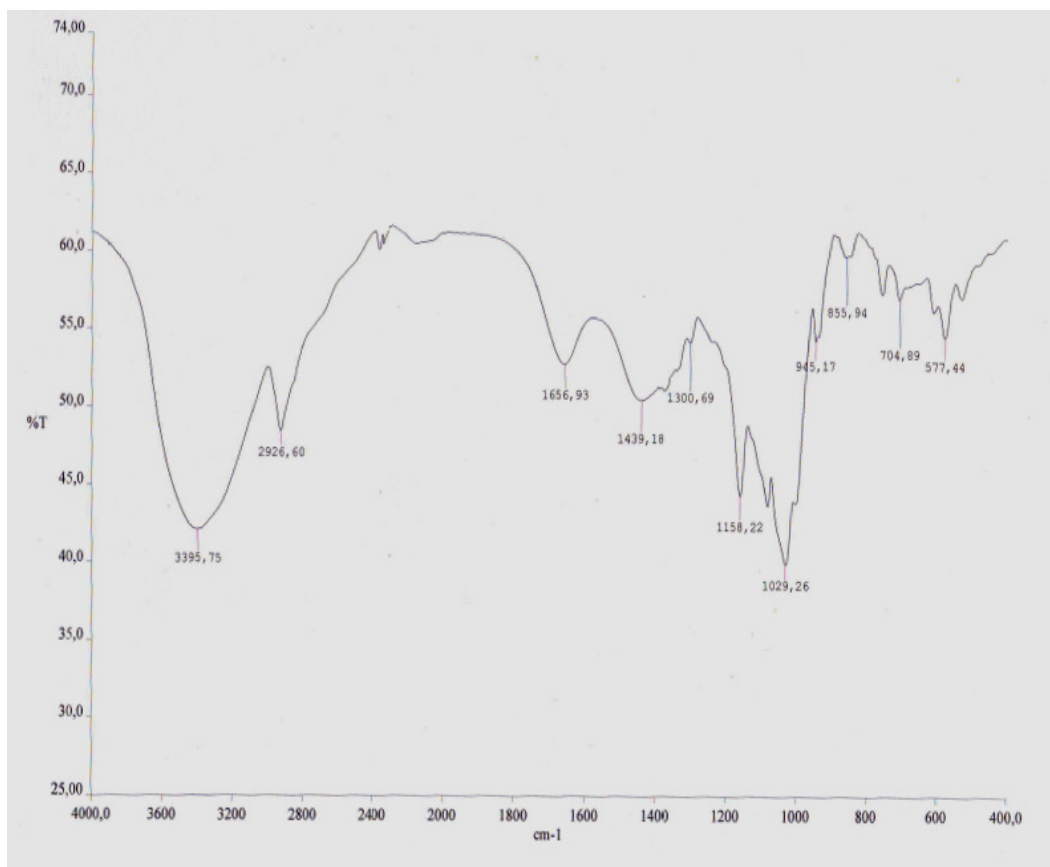


FIGURA 32 – Spettro FT-IR della β -CD-EDA.

Dall'analisi UV della β CD-EDA è stato ottenuto lo spettro di assorbimento riportato in figura 33, dal quale si evince che il prodotto presenta due massimi rispettivamente a 220 nm e a 241.5 nm.

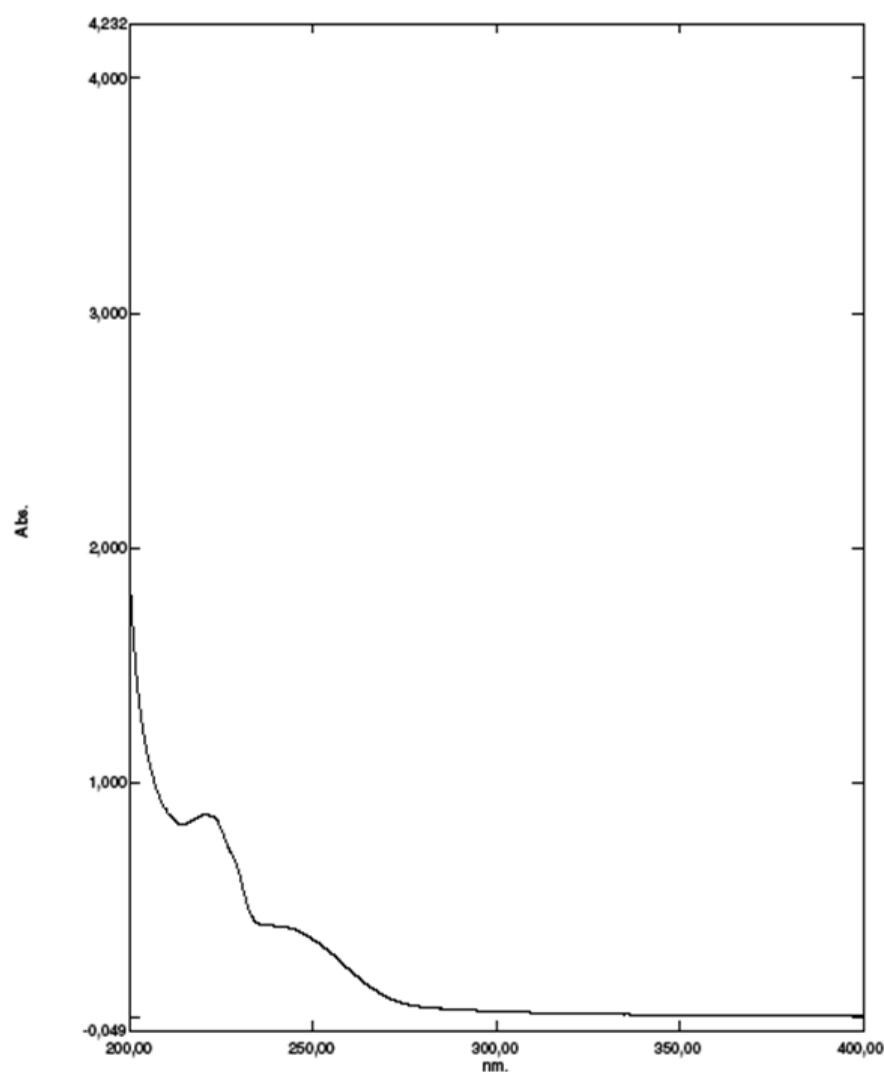


FIGURA 33 – Spettro UV della β CD-EDA

3.2.3. Sintesi e caratterizzazione del derivato HA-but- β CD-EDA

Tale derivato è stato ottenuto partendo dal derivato butirraldeidico dell'HA (forma acetaleica) disperso in H₂O bidistillata.

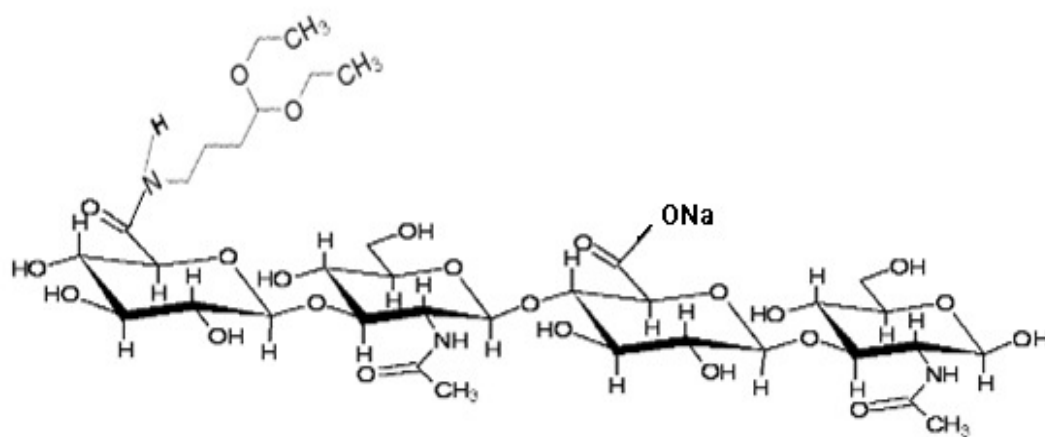
Dopo completa dispersione, il pH della soluzione è stato portato a 2.1 con acido ortofosforico 0.1M e la soluzione è stata posta a 60°C per un'ora e mezza al fine di liberare la forma aldeidica del derivato

dell'HA (HA-but-CHO). Successivamente il pH è stato portato a 6-6.8 con NaOH (0.1 M) e la temperatura è stata impostata a 50°C, quindi è stata aggiunta goccia a goccia nell'arco di 5 minuti, la β CD-EDA solubilizzata in H₂O bidistillata, in accordo ad un opportuno rapporto molare:

$$X' = \frac{\text{moli di } \beta\text{-CD-EDA}}{\text{moli di unità ripetitive di HA-but-CHO}} = 1$$

La reazione procede a 50°C sotto agitazione per 24 ore.

Dopo tale tempo, la miscela di reazione viene dializzata contro acqua distillata effettuando i cambi nei primi due giorni alternando acqua distillata e una soluzione acquosa di NaCl allo 0.5% p/v, al fine di evitare eventuali interazioni ioniche tra β CD-EDA e HA-but-CHO ed essere sicuri che il legame formato sia di tipo covalente, e nei tre giorni successivi solo con acqua. Lo schema di reazione è di seguito riportato (Schema 6).

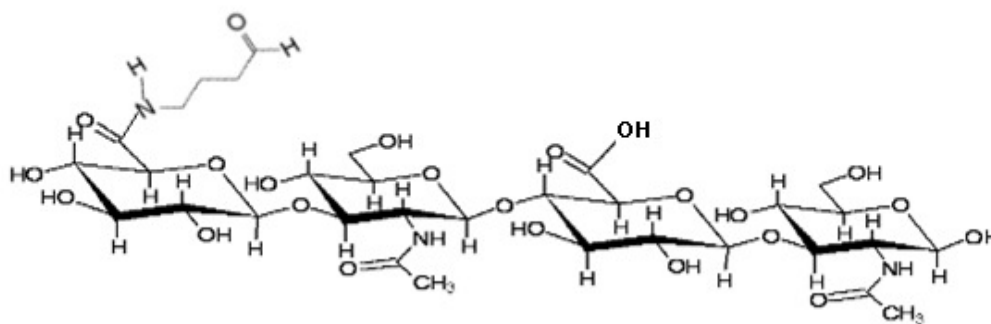


HA-but-CHO (forma acetlica)

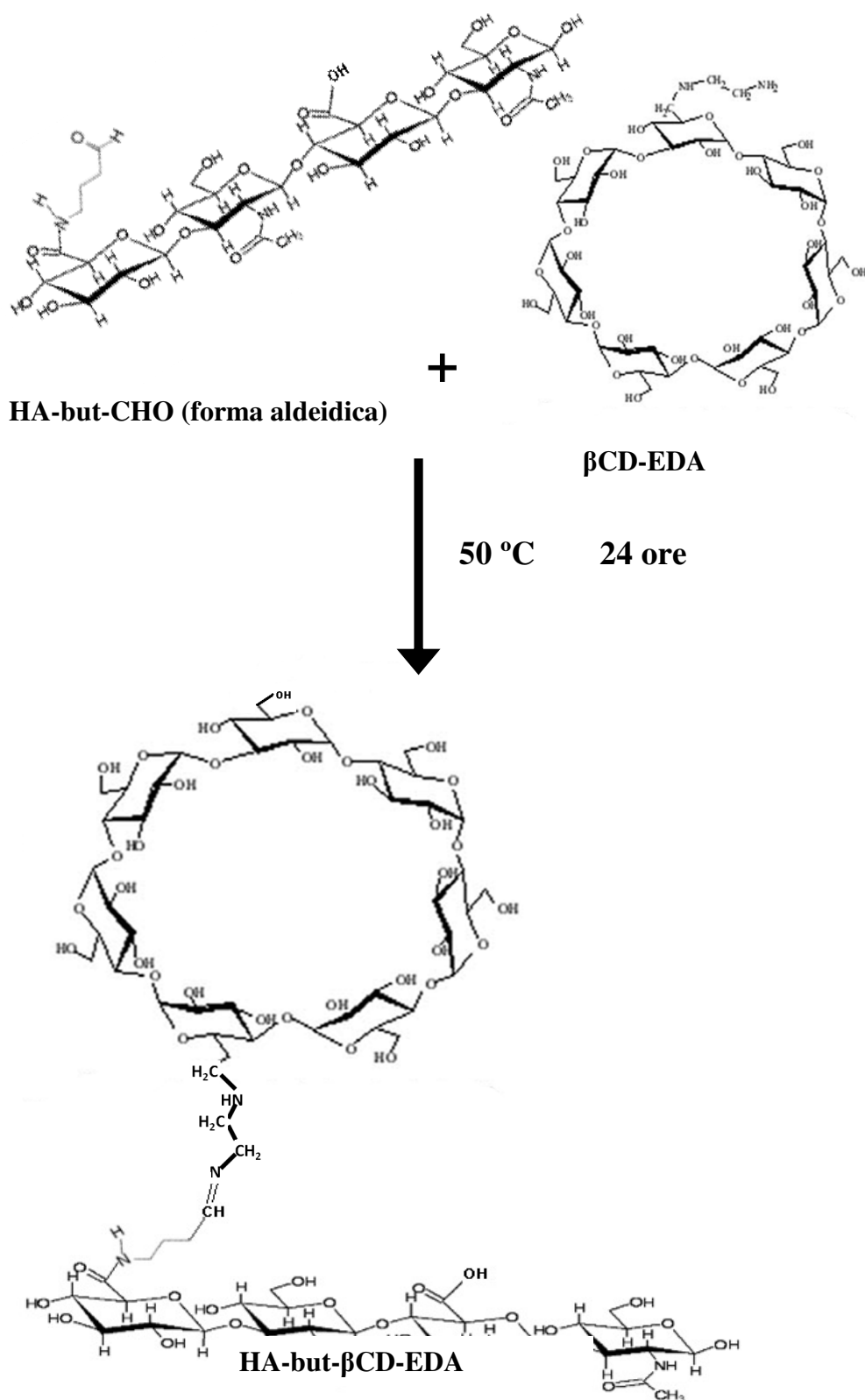


Idrolisi acida con acido orto fosforico

60 °C per 1.5 ore



HA-but-CHO (forma aldeidica)



SCHEMA 6 – Schema di sintesi del derivato HA-but- β CD-EDA

Il prodotto così ottenuto forma in acqua una dispersione gelatinosa ed è stato caratterizzato tramite analisi cromatografica su strato sottile (TLC), ^1H -NMR, FT-IR e UV. L'analisi mediante TLC (Figura 34) ha evidenziato che il prodotto è stato purificato e non presenta impurezze di βCD -EDA.

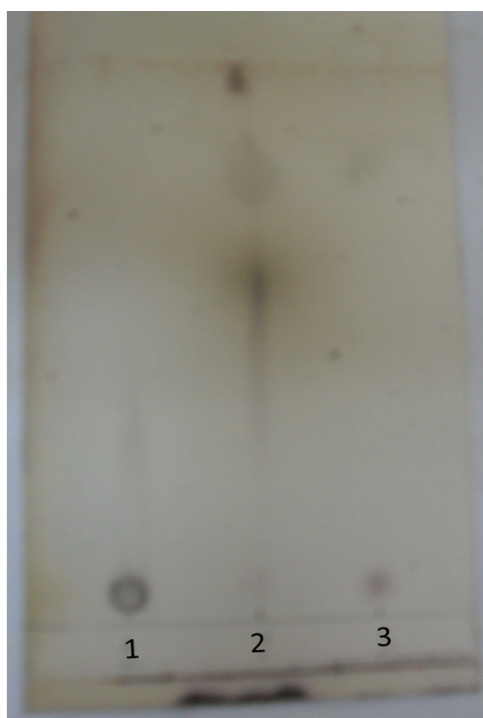


FIGURA 34 – Cromatografia su strato sottile

1: HA-but-CHO

2: βCD -EDA

3: HA-but- βCD -EDA

Lo spettro ^1H -NMR in miscela $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (5:1) (Figura 35) ha mostrato i seguenti segnali: un ampio multipletto

approssimativamente tra 3.2 e 3.9 δ che corrisponde al segnale dei protoni degli anelli zuccherini dell' HA e della β CD; un picco a 4.514 δ corrispondente ai due protoni anomERICI legati al carbonio 1 di entrambi gli anelli presenti nell'unità ripetitiva dell'HA e ai protoni dei gruppi $-OH$ della β CD (s, 6H,C6-OH) e dell' HA; i protoni del CH_3 del gruppo n-acetilico dell' HA sono assegnati al picco ben definito a 1.851 δ ; un picco a 4.878 δ relativo ai protoni del carbonio 1 delle unità di glucosio della β CD-EDA; ed infine un picco a 4.963 δ (s, 7H,C3-OH) ed un picco a 5.593 δ (s, 7H, C2-OH).

Il grado di derivatizzazione (DD) molare percentuale in β CD-EDA del prodotto ottenuto HA-but- β CD-EDA è stato determinato mediante 1H -NMR in miscela DMSO- d_6 /D $_2$ O in rapporto 5:1, e calcolato come segue:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{moli di } \beta\text{CD-EDA})}{(\text{n}^\circ \text{moli di unità ripetitive di HA-but-CHO})} \times 100$$

comparando l'integrale del picco a 4.963 δ relativo ai protoni del carbonio 1 delle unità di glucosio della β CD-EDA con l'integrale del picco attribuito ai protoni metilici appartenenti all'HA-but-CHO (1.851 δ) ed è risultato pari al $4.63 \pm 2\%$ in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di HA-but-CHO.

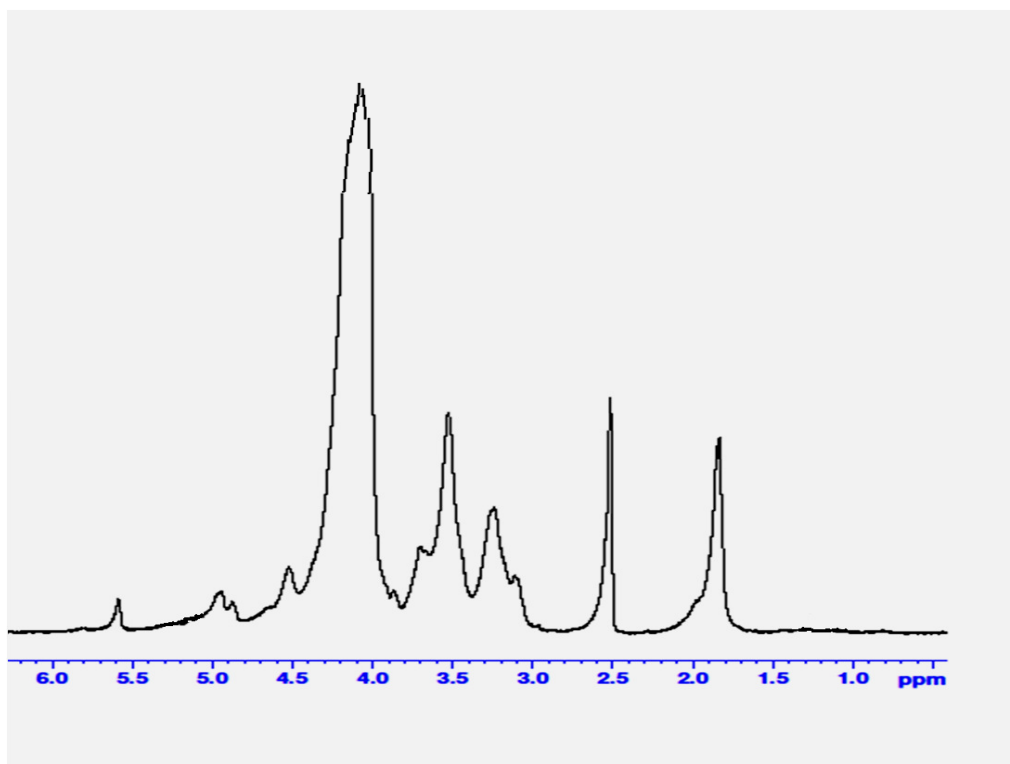


FIGURA 35 – Spettro ^1H -NMR in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (5:1) del derivato HA-but- βCD -EDA

Lo spettro FT-IR del derivato HA-but- βCD -EDA è riportato in figura 36, in cui è possibile osservare la presenza di: una banda a 3421.55 cm^{-1} (OH e NH stretchings), una banda a 1636.24 cm^{-1} (C=N stretching, NH bending, stretching ammidine primaria), una banda a 1419.87 cm^{-1} (bending dell' OH del gruppo COOH), ed infine una banda a 1152.44 cm^{-1} (C-O stretching).

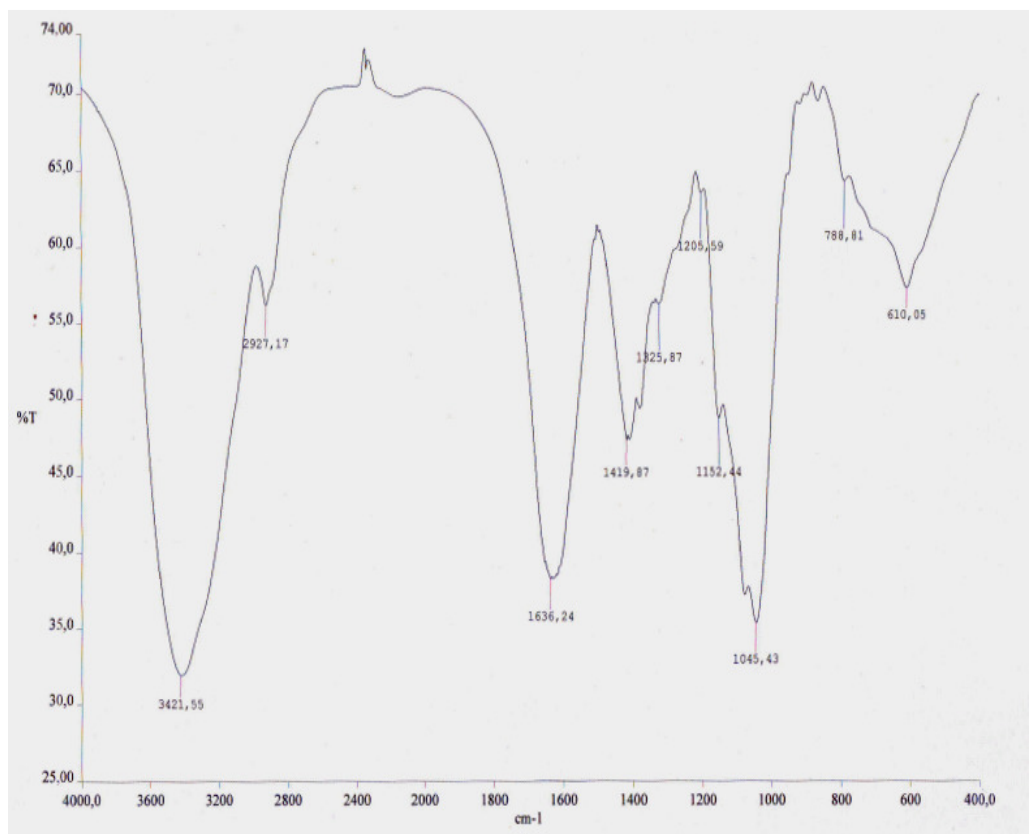


FIGURA 36 – Spettro FT-IR del derivato HA-but- β CD-EDA

L'analisi UV del derivato ottenuto ha riportato tale spettro di assorbimento con un massimo a 231 nm (Figura 37).

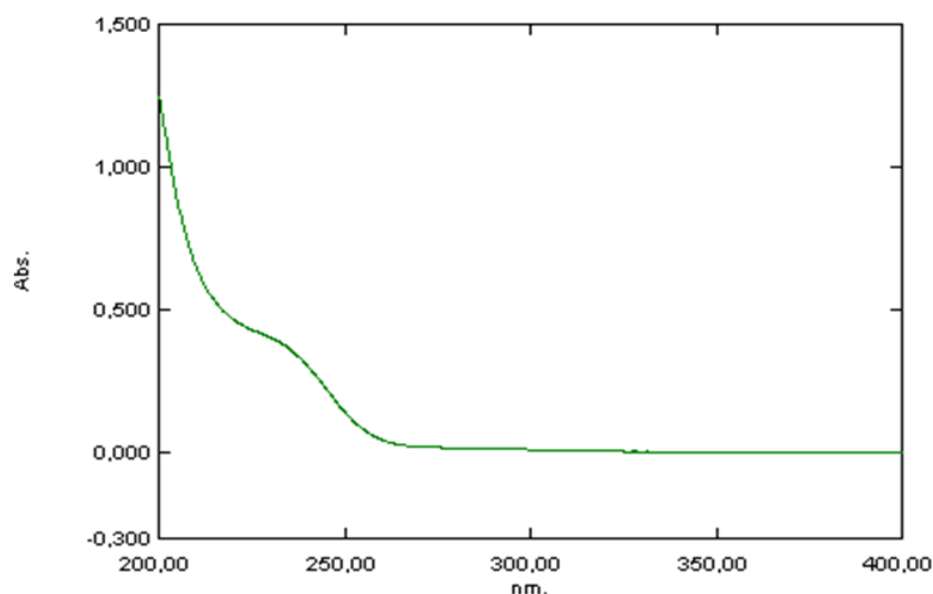


FIGURA 37 – Spettro UV del derivato HA-but- β CD-EDA

Nella figura 38 è mostrata la sovrapposizione delle tre curve di assorbimento UV relative all'HA-but-CHO, al β CD-EDA e al derivato HA-but- β CD-EDA. L'andamento delle curve, ed in particolare di quella relativa all'HA-but- β CD-EDA, ha fornito un'ulteriore prova del fatto che nel prodotto finale è presente il derivato etilendiamminico della β CD. Il tipo di andamento della curva relativa all'HA-but- β CD-EDA, che è differente da quello della curva di assorbanza relativa alla β CD-EDA, ha suggerito che probabilmente la β CD-EDA ha subito una modificazione, dovuta al legame covalente con l'HA.

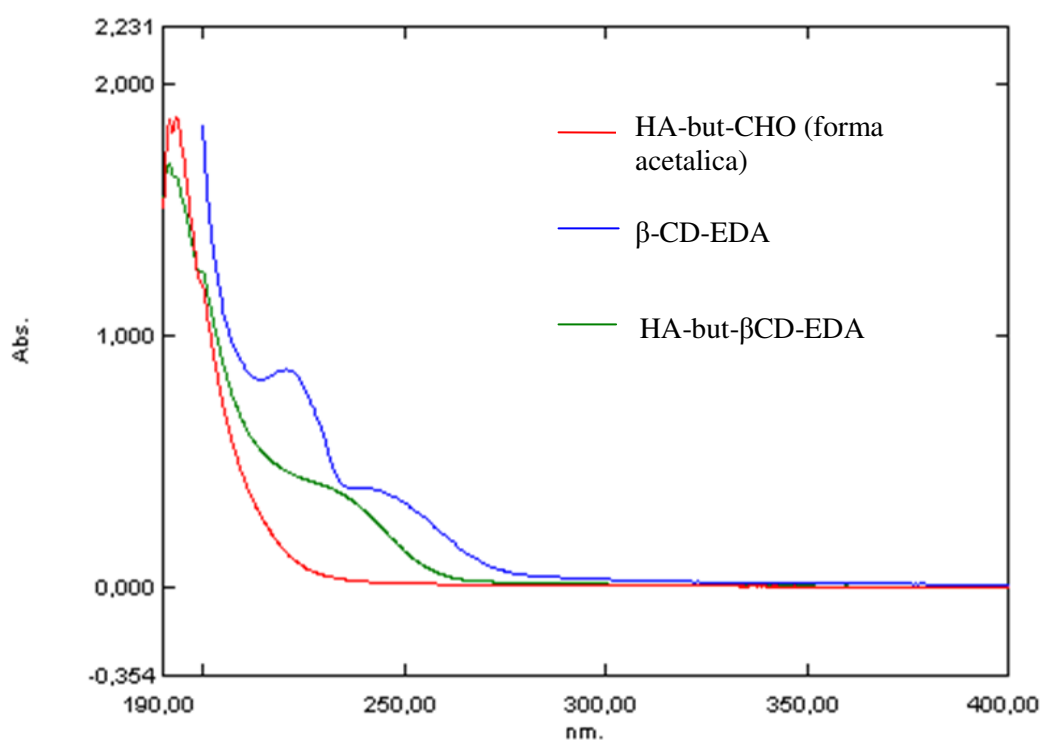


FIGURA 38 – Spettri UV relativi all'HA-but-CHO (forma acetalica), al derivato βCD-EDA e al derivato HA-but-βCD-EDA.

3.2.4. Conclusioni

Il lavoro sperimentale effettuato ha portato alla sintesi di un nuovo derivato, siglato come HA-but- β CD-EDA, ottenuto dalla reazione tra l'acido ialuronico e la β -CD, entrambi opportunamente funzionalizzati con porzioni butirraldeidiche e porzioni etilendiamminiche rispettivamente, allo scopo di ottenere un materiale che, tenendo conto delle caratteristiche di entrambi i composti di partenza, potrebbe trovare applicazione per il rilascio di farmaci lipofili.

Il derivato ottenuto è stato caratterizzato tramite diverse analisi, quali la cromatografia su strato sottile (TLC), analisi ^1H -NMR, spettrofotometria FT-IR e UV. Tali analisi hanno messo in evidenza la purezza del derivato e l'avvenuto legame covalente tra i due composti di partenza opportunamente funzionalizzati. Ulteriori studi saranno effettuati al fine di valutare le potenzialità del nuovo materiale in campo farmaceutico e biomedico. In particolare, tenendo conto che il derivato HA-but- β CD-EDA è in grado di formare geli in fase acquosa, ma al contempo presenta anelli di ciclodestrina capaci di complessare molecole lipofile, una potenziale applicazione potrebbe riguardare la veicolazione di farmaci lipofili all'interno di geli idrofili. Inoltre, grazie alle capacità complessanti delle ciclodestrine e all'azione direzionante dell'HA verso il recettore CD44, sovraespresso

nelle cellule tumorali, un'ulteriore potenziale applicazione del derivato HA-but- β CD-EDA potrebbe riguardare la veicolazione sito specifica di farmaci antitumorali, qualora per esempio il materiale venisse usato per la produzione di sistemi nanoparticellari iniettabili per endovena. Infine, la biocompatibilità e la biodegradabilità dei prodotti di partenza rendono tale derivato un potenziale candidato per la produzione di scaffold da utilizzare nella medicina rigenerativa.

Ringraziamenti

Si ringrazia la NOVAGENIT S.R.L. per aver fornito l'acido ialuronico, impiegato in questo lavoro di tesi.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1. Idrogeli medicati non-fouling per il rivestimento di protesi in titanio

4.1.1. *Materiali*

Il sale sodico dell'acido ialuronico (HA) ad alto peso molecolare (HA_{HMW} , M_{W} 1500 kDa), la vancomicina, la tobramicina, le protesi in titanio rivestite in idrossiapatite sono stati gentilmente forniti dalla NOVAGENIT S.R.L. (Milano, Italia). RESOMER R 202 acido polilattico (PLA) (M_{W} 8000 Da) è stato acquistato dalla Bidachem-Boeringher Ingelheim (Milano, Italia). N,N'-Dicicloesilcarbodiimide (DCC), N-idrossisuccinimide (NHS), tetrabutylammonio idrossido (TBA-OH), l'acido cloridrico, il tampone salino fosfato Dulbecco (DPBS pH 7.4) e il reagente in soluzione o-ftaldialdeide (OPA) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). La resina a scambio cationico Dowex 50W×8-200, dietilamina (DEA), dimetilsolfossido (DMSO) anidro e O-2-Aminoetil-O'-metilpolietilene glicole 5.000 (PEG-NH₂) sono stati forniti da Fluka (Milano, Italia).

4.1.2. Apparecchiature

Gli spettri ^1H -NMR sono stati ottenuti con uno strumento Bruker AC-250.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati come compresse di KBr nel range $4000\text{--}400\text{cm}^{-1}$ usando uno Spettrofotometro Perkin-Elmer 1720 a trasformata di Fourier, con una risoluzione di 1 cm^{-1} ; ogni spettro è stato registrato dopo 100 scansioni.

L'analisi SEC è stata eseguita usando un sistema multidetector SEC equipaggiato con una pompa Water 600, un misuratore a indice di rifrazione Water 410 e una colonna Linear, fornita da Water (dimensione particellare $5\text{ }\mu\text{m}$). La curva di calibrazione è stata determinata usando standard di acido ialuronico acquistato da Hyalose (USA). Le condizioni di eluizione sono state le seguenti: tampone fosfato 200mM (pH 6.5)/MeOH 90:10 (v/v), e una velocità di flusso di 0.6 ml/min , ad una temperatura di 35°C . L'analisi cromatografica ad alte prestazioni (HPLC) è stata eseguita usando un cromatografo liquido Agilent 1100 SERIES equipaggiato con iniettore Agilent 7725i (dotato di un loop con volume pari a $20\text{ }\mu\text{L}$) e con rilevatore UV a lunghezza d'onda variabile serie Agilent 1100 interfacciato con una postazione computerizzata.

La colonna cromatografica è una reversed phase Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 con diametro interno 46 mm x 150 mm prodotta da Agilent. Per valutare il rilascio di vancomicina, la fase mobile usata è stata: potassio diidrogeno fosfato pH 2.8 5 mM / acetonitrile (96:4), flusso 1 ml/min. L'eluato proveniente dalla colonna è stato rilevato a una lunghezza d'onda pari a 280 nm. Per valutare il rilascio della tobramicina, la fase mobile usata è stata: 0.02M fosfato pH 6.5:Acetonitrile / 52:48, flusso 1 ml/min; inoltre poichè la tobramicina non assorbe la luce ultravioletta è stata effettuata una reazione tra il campione da analizzare e il reagente OPA [<https://www.varianinc.com/media/sci/apps/lc05.pdf>]. L'eluato proveniente dalla colonna è stato rilevato a una lunghezza d'onda pari a 254 nm.

4.1.3. Sintesi dei copolimeri HA-g-PLA

L'acido ialuronico a basso peso molecolare (HA_{LMW} – Low Molecular Weight) è stato ottenuto partendo da HA ad alto peso molecolare (HA_{HMW} – High Molecular Weight) avente un peso molecolare pari a 1500 kDa, mediante trattamento con una soluzione di HCl concentrato seguendo un metodo già riportato altrove [Palumbo F. S. et al 2006]. HA_{LMW} è stato reso solubile in solventi organici dopo

formazione del suo sale di tetrabutylammonio (TBA), ottenuto previa acidificazione dei gruppi carbossilici del sale sodico dell'HA, usando una resina acida (Dowex 50Wx8-200) e successiva neutralizzazione con tetrabutylammonio idrossido (TBA-OH), fino a pH 7 e dialisi esaustiva.

L'HA-TBA è stato recuperato dopo liofilizzazione e quindi caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) che ha confermato l'avvenuto scambio con il TBA. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) dell'HA-TBA mostra segnali a: δ 0.97 (m, 12 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 1.40 (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 1.64 (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 2.04 (s, 3H, -NH-CO-CH_3); δ 3.82 (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$).

La sintesi del derivato N-idrossisuccinimidico (NHS) del PLA (PLA-NHS) è stata eseguita in maniera analoga alla sintesi del derivato dell'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), riportata altrove (Yoo e Park, 2004). In particolare 4,8 grammi di PLA sono stati solubilizzati in 58 ml di diclorometano, alla soluzione di PLA vengono aggiunti 276 mg di NHS, quindi la reazione procede a temperatura ambiente, per 24 ore. Dopo aver concentrato la soluzione di reazione tramite parziale evaporazione di due terzi del diclorometano, il prodotto è stato precipitato in 200 ml di etanolo e lavato nello stesso solvente per

5 volte separando il solido di volta in volta tramite centrifugazione a 9800 rpm a 20°C per 20 minuti. Quindi il solido ottenuto è stato filtrato e seccato sotto vuoto. In tale maniera è stato ottenuto un solido cristallino bianco, con una resa superiore all'80 % in peso rispetto alla quantità di PLA di partenza. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ ha confermato l'avvenuta attivazione del gruppo carbossilico del PLA con l'*N*-idrossisuccinimide. Il grado di derivatizzazione molare percentuale, espresso come rapporto tra le moli di NHS legate e le moli di singola catena di PLA, è risultato essere pari al 90 %.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto PLA-NHS (CDCl_3) mostra segnali a: δ 1.5 e δ 1.6 (d, 3H, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$; d, 3H, $\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$), δ 2.80 (m, 4H, $-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$); δ 4.3 e δ 5.2 (m, 1H, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$; m, 1H, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$).

Ogni singolo lotto di copolimero HA-g-PLA è stato ottenuto partendo da 600 mg di HA-TBA che sono stati solubilizzati in 48 ml di DMSO anidro in presenza di 576 μl del catalizzatore dietilammina (DEA). Successivamente il PLA-NHS (solubilizzato in 6 ml di DMSO anidro) è stato aggiunto in accordo ad un opportuno rapporto tra le moli di PLA-NHS e le moli delle unità ripetitive di HA-TBA in modo tale da ottenere diversi campioni contenenti un diverso grado di derivatizzazione molare % in PLA.

La soluzione di PLA-NHS è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di HA-TBA in un intervallo di tempo pari ad 1 ora.

Dopo 24 ore in atmosfera anidra (sotto argon) a 40°C, la miscela di reazione è stata fatta fluire in resina a scambio sodico Dowex per scambiare il TBA con Na⁺. L'eluato è stato dunque posto in dialisi contro acqua distillata allo scopo di eliminare il DMSO, quindi congelato ed essiccato tramite freeze-drying. Il solido è stato lavato ripetutamente in acetone ed essiccato nuovamente.

Lo spettro FT-IR dei copolimeri HA-g-PLA ha mostrato una banda a 3540 cm⁻¹ (ν_{as} OH + ν_{as} NH of HA), bande a 1757 (ν_{as} COO del PLA), 1623 (Ammide I dell'HA), 1456 (ν_{as}, CH₃ del PLA), 1382 (ν_s CH₃ del PLA), 1189 (ν_s C-O-C dei gruppi esterei del PLA), 1089, 1048 (ν C-O alcolico ed etereo dell'HA) cm⁻¹.

Lo spettro ¹H-NMR dei copolimeri HA-g-PLA (DMSO-*d*₆/D₂O 90:10) mostra: δ 1.25 ed δ 1.45 (2d, -O-CO-CH(CH₃)-O- del PLA); δ 1.85 (s, 3H, -NH-CO-CH₃ dell'HA) δ 5.1 ppm (m, -O-CO-CH(CH₃)- del PLA).

Il grado di derivatizzazione molare percentuale (DG mol%) in PLA dei derivati HA-g-PLA è stato calcolato come segue (n° moli di PLA/n° moli di unità ripetitive di HA) x 100 comparando gli integrali dei due picchi correlati a protoni attribuibili ai gruppi metilici della

catena di PLA a δ 1.25 e δ 1.45, con l'integrale correlato ai protoni a δ 1.85, attribuibile a $-\text{NHCOCH}_3$, appartenente ai residui di N-acetilglucosamina di HA.

4.1.4. Sintesi dei copolimeri PEG-g-HA-g-PLA

Per procedere alla sintesi dei derivati PEGilati PEG-g-HA-g-PLA è stato necessario isolare il sale tetrabutylammonico del copolimero HA-g-PLA. In particolare dopo 24 ore di reazione tra HA-TBA e PLA-NHS, la miscela di reazione è stata direttamente precipitata in etere dietilico ed il prodotto solido ottenuto è stato recuperato per filtrazione e ripetutamente lavato in acetone, il prodotto così purificato è stato essiccato sotto vuoto [Pitarresi G., et al (2007)].

Successivamente, 300 mg del copolimero HA-TBA-g-PLA vengono solubilizzati in 24 ml di DMSO anidro sotto argon. Quindi una opportuna quantità di PEG-NH₂ viene solubilizzata in 6 ml di DMSO, e tale soluzione è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di HA-TBA-g-PLA. La quantità di PEG-NH₂ da aggiungere è determinata in accordo ad un opportuno rapporto tra le moli di PEG-NH₂ e le moli di unità ripetitive di copolimero HA-TBA-g-PLA in modo tale da ottenere diversi campioni contenenti un diverso grado di derivatizzazione molare % in PEG-NH₂. La reazione viene condotta in

presenza degli attivatori DCC ed NHS che vengono aggiunti in quantità equimolari al PEG-NH₂ utilizzato. Dopo 24 ore a temperatura ambiente, la miscela di reazione viene posta a 5°C per 10 min, quindi filtrata al fine di rimuovere tutta la dicicloesilurea (DCU) non reagita e precipitata. La miscela di reazione filtrata viene quindi fatta eluire in resina sodica Dowex 50W x 8-200 al fine di rimuovere il TBA, dunque l'eluato è posto in dialisi contro acqua utilizzando una membrana da dialisi Spectra/por Tubing con un cut-off pari a 3500 Da, al fine di rimuovere tutto il DMSO. Il prodotto recuperato dopo freeze-drying è stato solubilizzato in acqua e fatto eluire in resina acida Dowex 50W x 8-200; l'eluato è stato definitivamente purificato tramite dialisi contro soluzioni di NaCl concentrato (5% p/v) per tre giorni e contro acqua bidistillata per gli ultimi due giorni, utilizzando una membrana da dialisi Spectra/por Tubing 12000/14000 Da. La soluzione è stata infine essiccata tramite freeze-drying.

L'analisi ¹H-NMR dei copolimeri PEG-g-HA-g-PLA mostra (THF-d₈/D₂O 1/1): δ 1.4 e 1.6 [2d, 3H, -O-CO-CH(CH₃)-O- di PLA], δ 2.1 (s, 3H, -NH-CO-CH₃ di HA), 4.0 (m, 4H, -CH₂-CH₂- of PEG), δ 5.40 [m, 1H, -O-COCH(CH₃)- di PLA].

Il grado di derivatizzazione molare percentuale (DG mol%) in PEG-NH₂ è stato calcolato comparando l'integrale dei picchi relativi ai

protoni attribuibili alla porzione $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ del PEG-NH₂ (δ 4.0) con l'integrale relativo ad i protoni (δ 2.1) attribuibili al gruppo $-\text{NHCOCH}_3$ appartenente ai residui di N-acetilglucosamina di HA.

4.1.5. Formazione del gel

Ciascun copolimero HA-g-PLA o PEG-g-HA-g-PLA sintetizzato è stato disperso in un appropriato volume di acqua bi distillata e la miscela viene agitata vigorosamente al vortex sino ad ottenere un sistema gelatinoso e trasparente con una concentrazione di polimero compresa tra il 2.22% e 11.11% p/v. In alcuni esperimenti il copolimero HA-g-PLA o PEG-g-HA-g-PLA viene disperso in un appropriato volume di soluzione acquosa di NaOH in quantità stechiometrica per salificare i gruppi carbossilici dell'acido ialuronico.

4.1.6. Formazione della soluzione contenente il farmaco

Nel caso in cui è stato caricato un solo antibiotico nell'idrogel, una quantità opportuna di vancomicina liofilizzata è stata solubilizzata in un appropriato volume di acqua bidistillata. La soluzione viene agitata vigorosamente fin quando diventa trasparente. La tobramicina viene invece fornita come soluzione iniettabile acquosa a concentrazione pari a 100 mg/2ml. La concentrazione di vancomicina o tobramicina in tale soluzione risulta essere pari al 10 o al 20% p/v. Nel caso in cui

sono stati caricati due antibiotici contemporaneamente, una quantità opportuna di vancomicina liofilizzata è stata solubilizzata in un appropriato volume di soluzione iniettabile di tobramicina. La soluzione viene agitata vigorosamente fin quando diventa trasparente. La concentrazione di vancomicina e tobramicina in tale soluzione risulta essere pari al 10 o al 20% p/v per ciascun farmaco.

4.1.7. Caricamento della soluzione contenente il farmaco nel gel

La soluzione contenente il farmaco è stata versata nel contenitore contenente il gel e il sistema viene agitato per pochi minuti per favorire la diffusione dell'antibiotico all'interno del gel. Il gel finale, contenente il farmaco, risulta avere una concentrazione in polimero nel range 2-10% p/v, e in farmaco pari all'1 oppure al 2% p/v, in funzione del volume e della concentrazione della soluzione di farmaco aggiunta al gel.

4.1.8. Caricamento sulla protesi del gel contenente il farmaco e studi di rilascio in vitro

Circa 200 mg di gel caricati con vancomicina o tobramicina, o con entrambi gli antibiotici sono stati adoperati per ricoprire completamente la superficie della protesi che ha un'area di 2 cm². La protesi ricoperta di gel è stata immersa in 6 ml di tampone fosfato

Dulbecco (DPBS pH 7.4) e il sistema è stato incubato a 37°C. A tempi prestabiliti (2-4-24-48-72-96 ore), dal sistema è stato prelevato 1 ml di soluzione, ripristinato con 1 ml di DPBS pH 7.4 fresco in modo da mantenere le condizioni “sink”. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. La quantità di farmaco rilasciata è stata determinata tramite analisi HPLC le cui condizioni operative sono state riportate nella sezione “4.1.2. Apparecchiature”.

4.1.9. Impianto di una protesi di titanio rivestita dal gel di HA-g-PLA_(C)

Si ottiene un femore umano liofilizzato da una banca delle ossa e si rimuove la sua testa, come comunemente noto nell'intervento chirurgico per la sostituzione totale dell'anca. Si prepara una sede per la protesi nello stelo femorale in un modo che è ben noto agli esperti in queste applicazioni chirurgiche. Si ottiene una sede per la protesi nella diafisi dell'osso in un modo che è ben noto agli esperti in questo settore. Lo stelo femorale viene aperto longitudinalmente tagliandolo lungo un piano essenzialmente parallelo al suo asse, per una lunghezza leggermente maggiore della lunghezza della protesi, e tagliando poi perpendicolarmente rispetto a detto asse, così da rimuovere uno dei due “rami” lunghi prodotti dal primo taglio. In

questo modo, il canale midollare viene esposto nelle parti in cui verrà poi accomodata la protesi, sia nella parte che resta collegata al corpo principale del femore, che nel “ramo” staccato. Poi questi vengono riuniti e saldamente tenuti assieme per mezzo di dispositivi di fissaggio in metallo e in plastica. A parte, viene preparata la protesi che è il modello Recta della Adler Ortho s.r.l. di Bologna, Italia. Prima dell’inserimento nella sede ottenuta nel femore, la superficie esterna della protesi (esclusa la parte superiore, da collegare con un collo modulare della stessa azienda nell’intervento chirurgico effettivo) viene rivestita per mezzo di trattamento a pennello manuale con un idrogel di HA-g-PLA_(C) preparato al 10% p/v (DD=7%) e caricato con 0,5% di blu di metilene, allo scopo di rendere più visibile la presenza e la distribuzione dell’idrogel in ispezioni successive sia sulla protesi che nella sede del femore. La protesi viene quindi inserita a pressione nella sede precedentemente ottenuta nel femore. Dopo tre minuti, vengono rimossi i dispositivi di fissaggio, il femore viene e viene ispezionata visivamente la distribuzione dell’idrogel nelle superfici interne della cavità ossea midollare e sulla superficie della protesi.

4.2. Sintesi e caratterizzazione di un nuovo derivato acido ialuronico- β ciclo destrina

4.2.1. *Materiali*

Il sale sodico dell'acido ialuronico (HA) ad alto peso molecolare (M_w 1500 kDa) è stato gentilmente fornito dalla NOVAGENIT S.R.L. (Milano, Italia). Il tetrabutylammonio idrossido (TBA-OH), l'acido cloridrico (HCl), l'idrossido di sodio (NaOH), l'acetone, l'etanolo, l'acido ortofosforico, il cloruro di sodio (NaCl), l'N-metil-2-Pirrolidone anidro (NMP anidro), l'acido metansolfonico anidro, la 4-amino butirraldeide dietilacetale e l'1,1'-Carbonildiimidazolo (CDI) sono stati acquistati alla Sigma Aldrich (Milano, Italia). La resina a scambio cationico Dowex 50W \times 8-200 e l'etilendiamina (EDA) sono stati forniti dalla Fluka (Milano, Italia). La 6-O-monotosil- β -ciclodestrina è stata acquistata alla Cyclolab Ltd (Ungheria).

4.2.2. *Apparecchiature*

Gli spettri ^1H -NMR sono stati ottenuti con uno strumento Bruker AC-250. Gli spettri FT-IR sono stati registrati come compresse di KBr nel range $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ usando uno Spettrofotometro Perkin-Elmer 1720 a trasformata di Fourier, con una risoluzione di 1 cm^{-1} ; ogni spettro è stato registrato dopo 100 scansioni. Le centrifugazioni sono state eseguite con una centrifuga Beckman Coulter Allegra X-22R

equipaggiata con un rotore ad angolo fisso F0850 e un sistema refrigerante. Gli spettri UV-VIS sono stati registrati in acqua usando uno spettrofotometro SHIMADZU UV-2401 PC.

4.2.3. Sintesi del derivato HA-but- β CD-EDA

L'acido ialuronico a basso peso molecolare (HA_{LMW} – Low Molecular Weight) è stato ottenuto a partire da HA ad alto peso molecolare (HA_{HMW} -High Molecular Weight) avente un peso molecolare pari a 1500 kDa, mediante trattamento con una soluzione di acido cloridrico concentrato seguendo un metodo già riportato altrove (Palumbo F. S. et al., 2006). HA_{LMW} è stato reso solubile in solventi organici dopo formazione del suo sale di tetrabutylammonio (TBA), ottenuto previa acidificazione dei gruppi carbossilici del sale sodico dell'HA, usando una resina acida (Dowex 50Wx8-200) e successiva neutralizzazione con tetrabutylammonio idrossido (TBA-OH), fino a pH 7 e successiva liofilizzazione. L'HA-TBA è stato recuperato dopo liofilizzazione e caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) che ha confermato l'avvenuto scambio con il TBA. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) dell'HA-TBA ha mostrato segnali a:

0.97 δ (m, 12 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); 1.40 δ (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); 1.64 δ (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$);

2.04 δ (s, 3H, -NH-CO-**CH₃**); 3.82 δ (m, 8 H, N⁺(**CH₂**-CH₂-CH₂-CH₃)₄).

4.2.3.1. Sintesi del derivato butirraldeidico dell'acido ialuronico (forma acetalica)

250 mg di HA-TBA vengono solubilizzati in 13.3 ml di NMP anidro. Alla soluzione ottenuta vengono aggiunti 11.72 mg di CDI solido secondo il rapporto molare :

$$X = \frac{\text{moli di CDI}}{\text{moli di unità ripetitive di HA-TBA}} = 0.18$$

Alla miscela di reazione sono stati poi aggiunti 15 μ l di acido metansolfonico e 13.16 μ l di 4-amminobutirraldeide dietil acetale secondo un rapporto molare :

$$Y = \frac{\text{moli di 4-amminobutirraldeide dietil acetale}}{\text{moli di unità ripetitive di HA-TBA}} = 0.19$$

La reazione è stata condotta a 40°C per 28 ore.

Dopo tale tempo, sono stati aggiunti 1.4 ml di una soluzione acquosa satura di NaCl allo scopo di allontanare il TBA, e dopo 30 minuti sono stati aggiunti 42 ml di etanolo assoluto. Il precipitato formatosi è stato lavato per cinque volte in etanolo, e per due volte in acetone. Il solvente di lavaggio è stato allontanato per centrifugazione a 11800

rpm per 15 min a 4 °C e successivamente il prodotto è stato essiccato sotto vuoto e recuperato con una resa pari a 90% p/p.

Il prodotto è stato quindi caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ (in D_2O), spettrofotometria FT-IR (in KBr) e analisi UV (in acqua).

4.2.3.2. Sintesi del derivato etilendiamminico della betaciclodestrina ($\beta\text{CD-EDA}$)

La sintesi di $\beta\text{CD-EDA}$ è stata eseguita come riportato in letteratura (Giammona G. et al., 2006). Una soluzione di 200 mg di 6-O-monotosil- β -ciclodestrina in 2 ml di etilendiammina (EDA) viene posta ad una temperatura di 80°C per due ore. Dopo tale tempo, la miscela di reazione viene aggiunta goccia a goccia a 50 ml di acetone freddo (-10°C), il precipitato ottenuto è stato lavato cinque volte con aliquote da 20 ml ciascuna di acetone.

Il solvente di lavaggio è stato allontanato per centrifugazione a 11800 rpm per 15 min a 4 °C. Infine il prodotto viene essiccato sotto vuoto. Il prodotto finale è stato ottenuto con una resa in peso rispetto al prodotto di partenza pari all'85 % p/p.

Il prodotto è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ (in D_2O), spettrofotometria FT-IR (in KBr) e analisi UV (in acqua).

4.2.3.3. Sintesi del derivato betaciclodestrinico dell'HA (HA-but-βCD-EDA)

Ogni singolo lotto di copolimero HA-but-βCD-EDA è stato ottenuto partendo da 200 mg del derivato butirraldeidico dell'acido ialuronico (forma acetaleica) che sono stati solubilizzati in 20 ml di H₂O bidistillata. Il pH della soluzione è stato poi portato a 2.1 con acido ortofosforico 0.1M. In questo modo è stata ottenuta, per idrolisi, la forma aldeidica del derivato butirraldeidico dell'HA (HA-but-CHO). La soluzione è stata posta a 60°C per un'ora e mezza. Successivamente il pH è stato portato a 6-6.8 con NaOH (0.1 M) e la temperatura a 50°C. Alla soluzione è stata aggiunta goccia a goccia nell'arco di 5 minuti, la βCD-EDA solubilizzata in 2 ml di H₂O bidistillata, in accordo ad un opportuno rapporto molare:

$$X' = \frac{\text{moli di } \beta\text{CD-EDA}}{\text{moli di unità ripetitive di HA-but-CHO}} = 1$$

La reazione procede a 50°C sotto agitazione per 24 ore.

Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata dializzata contro acqua distillata utilizzando tubi da dialisi con cut off 12.000-14.000 Da (Spectra/Por) ed effettuando i cambi nei primi due giorni alternando acqua distillata e una soluzione acquosa di NaCl allo 0.5%p/v, al fine di evitare la formazione di eventuali interazioni ioniche tra βCD-EDA

e HA-but-CHO, e nei tre giorni successivi solo con acqua. Successivamente il prodotto è stato sottoposto a freeze-drying ed analizzato mediante cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando come fase mobile acetonitrile: acqua bidistillata (2:1), i campioni HA-but-CHO, β CD-EDA e HA-but- β CD-EDA sono stati solubilizzati rispettivamente in H₂O bidistillata, DMSO e miscela DMSO:H₂O bidistillata (5:1). Il prodotto è stato inoltre caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR (in miscela DMSO-d₆/D₂O in rapporto 5:1), spettrofotometria FT-IR (in KBr) e analisi UV (in acqua).

BIBLIOGRAFIA

- Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S. Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials*, 1997; 18:1411-1415.
- Adams, M. E., Atkinson, M. H., Lussier, A. J., Schulz, J. I., Siminovich, K. A., Wade, J. P., et al. The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a Canadian multicenter trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone. *Osteoarthritis & Cartilage*, 1995, 3(4), 213-225.
- Agnantis N.J., Goussia A.C., Batistatou A., Stefanou D. "Tumor markers in patients: an update of their prognostic significance. Part 2." *In Vivo*; 2004, 18 (4) pp. 481-8.
- Alaniz L, García MG, Gallo-Rodriguez C, Agusti R, Sterín-Speziale N, Hajos SE, Alvarez E. "Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF-kappaB transcription factor" *Glycobiology*, 2006, 16(5):359-67.
- Allcock HR. Functional polyphosphazenes, in *Functional Polymers: Modern Synthetic Methods and Novel Structures* (A.O. Patil, D.N. Schulz B.N. Novak, eds.). ACS Symposium Series, Washington, 1998, Vol. 704, Ch. 18, pp. 261-275.
- Anderson JM and Shive MS, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1997, 28: 5-24.
- Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastrelli A, Donati L, Tenchini ML, Malcovati M. Human Keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid suitable for grafting. *Wounds*, 1991, 3: 116-125.

- Andreopoulos, Y., Agui, J. H. & Briassulis, G. Shock wave-turbulence interactions. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 2000, 32, 309-345.
- Antunes, J., Oliveira, J., Reis, R., Soria, J., Gómez-Ribelles, J., & Mano, J. Novel poly(l-lactic acid)/hyaluronic acid macroporous hybrid scaffolds: Characterization and assessment of cytotoxicity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 94(3), 856–869.
- Arifin DY, Lee LY, Wang CH. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58: 1274-1325.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C., & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, 1990, 61(7), 1303–1313.
- Athre, R. Facial filler agents. *Operative Techniques in Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, 2007, 18(3), 243–247.
- Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci*, 2004, 4:835–64.
- Auvinen, P., Tammi, R., Parkkinen, J., Tammi, M., Agren, U., Johansson, R., et al. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *American Journal of Pathology*, 2000, 156(2), 529–536.
- Avdeef A., Bendels S., Tsinman O., Tsinman K., Kansy M., Solubility excipient classification gradient maps, *Pharm. Res.*, 2007, 24 pp. 530-545.
- Avitabile T, Marano F, Castiglione F, Bucolo C, Cro M, Ambrosio L, Ferrauto C, Reibaldi A. Biocompatibility and biodegradation of intravitreal hyaluronan implants in rabbits. *Biomaterials*, 2001, 22(3):195-200.

- Bajorath J. “Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions.” *Proteins*, 2000, 39 (2) pp. 103-11.
- Balazs, E., & Leshchiner, A. 1968, US4582865.
- Balazs, E. Hyaluronan as an ophthalmic viscoelastic device. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 9(4), 236–238.
- Banerji, S., Wright, A., Noble, M., Mahoney, D., Campbell, I., Day, A., et al. Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate–protein interaction. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2007, 14(3), 234–239.
- Barbucci, R., Rappuoli, R., Borzacchiello, A., & Ambrosio, L. Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2000, 11(4), 383–399.
- Bather Christensen J, Andersen BM, Thomassen SM, Johansen O, Lie M. The effects of ‘in-use’ surgical handwashing on the pre- and postoperative fingertip flora during *Journal of Hospital Infection*, 1995, 30: 283-293.
- Bellini, D., & Topai, A. (2000). WO200001733.
- Bencherif, S., Srinivasan, A., Horkay, F., Hollinger, J., Matyjaszewski, K., & Washburn, N. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*, 2008, 29(12), 1739–1749.
- Benedetti L, Cortivo R, Berti A, Pea F, Mazzi M, Moras M, Abatangelo G. Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (HYAFF) implanted in rats, *Biomaterials*, 1993, 14:1154-1160.
- Benedetti L. New Biomaterials from hyaluronic acid, *Med Dev Technol*, 1994, 11: 32-37.

- Benedetti, L., Topp, E., & Stella, V. Microspheres of hyaluronic acid esters – Fabrication methods and in vitro hydrocortisone release. *Journal of Controlled Release*, 1990 13(1), 33–41.
- Benjamin T. et al, 2008
- Bennett, R., & Taher, M. Restylane persistent for 23 months found during Mohs micrographic surgery: A source of confusion with hyaluronic acid surrounding basal cell carcinoma. *Dermatologic Surgery*, 2005, 31(10), 1366–1369.
- Bergman, K., Elvingson, C., Hilborn, J., Svensk, G., & Bowden, T. Hyaluronic acid derivatives prepared in aqueous media by triazine-activated amidation. *Biomacromolecules*, 2007, 8(7), 2190–2195.
- Bodnár, M., Daróczy, L., Batta, G., Bakó, J., Hartmann, J., & Borbély, J. Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, 2009, 287(8), 991–1000.
- Borzacchiello, A., Mayol, L., Schiavinato, A., & Ambrosio, L. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 92(3), 1162–1170
- Brewster M.E., Mackie C., Lampo A., Noppe M., Loftsson T.,. The use of solubilizing excipients and approaches to generate toxicology vehicles for contemporary drug pipelines, in: Augustijns P. and Brewster M.E. (Eds.), *Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, American Association of Pharmaceutical Scientists and Springer: New York, 2007, pp. 221-256.
- Brown, T., Laurent, U., & Fraser, J. Turnover of hyaluronan in synovial joints: Elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit. *Experimental Physiology*, 1991, 76(1), 125–134.

- Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Guidolin D, Daga Gordini D, Cortivo R.. Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 1999, 46(3): 337-46.
- Bulpitt, P., & Aeschlimann, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 47(2), 152–169.
- Burdick, J., Chung, C., Jia, X., Randolph, M., & Langer, R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1), 386–391.
- Burns, J., Cox, S., & Walts, A. Water insoluble derivatives of hyaluronic acid. 1991, US 5017229.
- Cai, S., Xie, Y., Bagby, T., Cohen, M., & Forrest, M. Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan–cisplatin conjugate. *Journal of Surgical Research*, 2008, 147(2), 247–252.
- Cai, Xie, Bagby, Cohen, e Forrest (2008 Caliceti P, Elvassore N and Bertuccio A. Production of insulin loaded PEG/PLA nanoparticles by gas anti-solvent techniques, *J. Pharm. Sci.*, 2001, 90: 1628–1636.
- Caliceti P, Salmaso S, Elvassore N, Bertuccio A. Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by gas anti-solvent techniques, *J. Control. Release*, 2004, 94: 195–205.
- Caliceti P, Salmaso S, Lante A, Yoshida M, Katakai R, Martellini F, Mei LHI and Carenza M. Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels obtained by radiation polymerisation. *J. Control Release*, 2001, 75: 173–181.
- Capoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 1998, 19:2101-2127.

- Cascone, M. G., Sim, B., & Sandra, D. Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials*, 1995, 16(7), 569–574.
- Cera, C., Terbojevich, M., Cosani, A., & Palumbo, M. Anthracycline antibiotics supported on water-soluble polysaccharides: Synthesis and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1988, 10(2), 66–74.
- Chasin M, Langer R. (eds.). *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 1990, Volume 45, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Chen WJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*, 1999, 7(2): 79-89. Review.
- Cheng Y, Deng S, Chen P, Ruan R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Front Chem China*, 2009, 4:259–64.
- Choi, K., Min, K., Na, J., Choi, K., Kim, K., Park, J., et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: Synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19(24), 4102–4107.
- Claudius JS, Neau SH. Kinetic and equilibrium characterization of interactions between glycopeptide antibiotics and sodium carboxymethyl starch. *Int J Pharm*, (1996) 144: 71-79.
- Chytil, M, & Pekař, M. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: Evaluation of self-aggregation. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76(3), 443–448.
- Collins, M., & Birkinshaw, C. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 104(5), 3183–3191.

- Collins, M., & Birkinshaw, C. Investigation of the swelling behavior of crosslinked hyaluronic acid films and hydrogels produced using homogeneous reactions. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008a, 109(2), 923–931.
- Collins, M., & Birkinshaw, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008b, 19(11), 3335–3343.
- Coradini, D., Pellizzaro, C., Miglierini, G., Daidone, M., & Perbellini, A. Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: Improvement of the antiproliferative activity on a breast-cancer cell line. *International Journal of Cancer*, 1999, 81(3), 411–416.
- Cortivo R, Brun P, Rastrelli A, Abatangelo G. In vitro studies of biocompatibility of hyaluronic acid esters, *Biomaterials*, 1991, 12: 727-736.
- Coutu DL, Yousefi AM, Galipeau J. Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. *J Cell Biochem*, 2009, 108: 537–46.
- Crescenzi, V., Francescangeli, A., Capitani, D., Mannina, L., Renier, D., & Bellini, D. Hyaluronan networking via Ugi's condensation using lysine as crosslinker diamine. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 53(3), 311–316.
- Crescenzi, V., Francescangeli, A., Segre, A., Capitani, D., Mannina, L., Renier, D., et al. NMR structural study of hydrogels based on partially deacetylated hyaluronan. *Macromolecular Bioscience*, 2002, 2(6), 272–279.
- Crescenzi, V., Francescangeli, A., Taglienti, A., Capitani, D., & Mannina, L. Synthesis and partial characterization of hydrogels obtained via glutaraldehyde crosslinking of acetylated chitosan and of hyaluronan derivatives. *Biomacromolecules*, 2003, 4(4), 1045–1054.

- Crouzier, T., Boudou, T., & Picart, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2010, 15(6), 417–426.
- Dahl, L., Laurent, T., & Smedsrod, B. Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: Coupling of ^{125}I tyramine- cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation. *Analytical Biochemistry*, 1988, 175(2), 397–407.
- Danishefsky, I., & Siskovic, E. Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters. *Carbohydrate Research*, 1971, 16(1), 199–205.
- Day, A., & Sheehan, J. Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(5), 617–622.
- De Belder, A., & Malson, T. (1986). WO86000912.
- De Jawger R, Gleria M. Poly(organophosphazene)s and related compounds: synthesis, properties and applications, *Progr. Polym. Sci.* 1998, 23: 179-276.
- De Nooy, A., Capitani, D., Masci, G., & Crescenzi, V. Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: Synthesis, behavior and solid-state NMR characterization. *Biomacromolecules*, 2000, 1(2), 259–267.
- DeAngelis, P. Monodisperse hyaluronan polymers: Synthesis and potential applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 9(4), 246–248.
- Decher, G., Hong, J. D., & Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 1992, 210–211(Part 2), 831–835.
- Dehazya, P., & Lu, C. Sodium hyaluronate microspheres. 2002, WO2002/041877.

- Della Valle, F. Crosslinked carboxy polysaccharides. 1994, EP341745.
- Della Valle, F., & Romeo, A. 1986, US4851521.
- Della Valle, F., & Romeo, A. 1989, WO198910941.
- Domb AJ, Amselem S, Langer R, Maniar M. Polyanhydrides as carriers of Drugs, in Biomedical Polymers, Designed-to-Degrade Systems (S:W: Shslaby, ed.), 1994, pp. 69-96, Hanser Publ., Munich.
- Drobnik, J. Hyaluronan in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, 7(2), 295–308.
- Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic acid technology. *Adv Mater*, 2000, 12: 1841–6.
- Dumitru S. (ed.). *Polymeric Biomaterials*, 1994, Marcel Dekker, Inc., New York. Elvassore N, Bertuccio A, Caliceti P. Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(l-lactide) (PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques, *Journal of pharmaceutical sciences*, 2001, 90: 1628-1636.
- Duncan, M., Liu, M., Fox, C., & Liu, J. Characterization of the N-deacetylase domain from the heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 339(4), 1232–1237.
- Durselen L, Dauner M, Hierlemann H, Planck H, Claes LE, Ignatius A. Resorbable polymer fibers for ligament augmentation. *J Biomed Mater Res*, 2001, 58:666–72.
- Eenschooten, C., Guillaumie, F., Kontogeorgis, G., Stenby, E., & Schwach-Abdellaoui, K. Preparation and structural characterisation of novel and versatile amphiphilic octenyl succinic anhydride-modified hyaluronic acid derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79(3), 597–605.
- Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study, *Biomaterials*, 1991, 12: 292-304.

- Esposito, G., Geninatti Crich, S., & Aime, S. Efficient cellular labeling by CD44 receptor-mediated uptake of cationic liposomes functionalized with hyaluronic acid and loaded with MRI contrast agents. *ChemMedChem*, 2008, 3(12), 1858–1862.
- Esposito, E., Menegatti, E., & Cortesi, R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: A comparative study. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288(1), 35–49.
- Eun, J., Kang, S., Kim, B., Jiang, G., Il, H., & Sei, K. Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 86(3), 685–693.
- Flückiger U, Zimmerli W. Factors influencing antimicrobial therapy of surface adhering microorganisms. *Recent Res Devel Antimicrob Agents Chemother*, (2000) 4:165-175.
- Follain, N., Montanari, S., Jeacomine, I., Gambarelli, S., & Vignon, M. Coupling of amines with polyglucuronic acid: Evidence for amide bond formation. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74(3), 333–343.
- Fouissac, E., Milas, M., Rinaudo, M., & Borsali, E. Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate. *Macromolecules*, 1992, 25(21), 5613–5617.
- Franzmann, E., Schroeder, G., Goodwin, W., Weed, D., Fisher, P., & Lokeshwar, V. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *International Journal of Cancer*, 2003, 106(3), 438–445.
- Fraser, J., Laurent, T., & Laurent, U. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, 242(1), 27–33.
- Galassi G, Brun P, Radice M, Cortivo R, Zanon GF, Genovese P, Abatangelo G. In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold, *Biomaterials*, 2000, 21: 2183-2191.

- Gentzkow GD, Iwasaki SD, Hershon KS, Mengel M, Prendergast JJ, Ricotta JJ, Steed DP, Lipkin S. Use of Dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers, *Diabetes Care*, 1996, 19: 350-354.
- Ghatak S, Misra S, Toole BP. „Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway”. *J Biol Chem.*, 2002, 277: 38013-38020.
- Ghosh, S., Kobal, I., Zanette, D., & Reed, W. Conformational contraction and hydrolysis of hyaluronate in sodium hydroxide solutions. *Macromolecules*, 1993, 26(17), 4685–4693.
- Ghosh, K., Shu, X., Mou, R., Lombardi, J., Prestwich, G., Rafailovich, M., et al. Rheological characterization of in situ cross-linkable hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules*, 2005, 6(5), 2857–2865.
- Giammona G et al 2006
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*, 2007, 80(21), 1921–1943.
- Glass, J., Dickerson, K., Stecker, K., & Polarek, J. Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix. *Biomaterials*, 1996, 17(11), 1101–1108.
- Gopferich A. Biodegradable polymers: Polyanhydrides, *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery* (E. Mathiowitz, ed.), 1999, Vol. 1, pp. 60-71, John Wiley & Sons, New York.
- Grey IE, Lowe G, Bale S, Harding KG. The use of cultured dermis in the treatment of diabetic foot ulcers, 1998, *J Wound Care* 7: 324-325.
- Griffith LG. Polymeric biomaterials. *Acta Mater*, 2000, 48:263–77.
- Guiot P., Couvrier P. (eds.). *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press, 1986, Inc, Boca Raton.

- Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. *Prog Polym Sci*, 2007, 34:455–82.
- Harris PA, Di Francesco F, Barisoni D, Leigh IM, Navsaria HA. Use of hyaluronic acid and cultured autologous keratinocytes and fibroblasts in extensive burns, *Lancet*, 1999, 353: 35-36.
- Hirano, K., Sakai, S., Ishikawa, T., Avci, F., Linhardt, R., & Toida, T. Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*, 2005, 340(14), 2297–2304.
- Hoekstra D. Hyaluronan-modified surfaces for medical devices, *Med. Dev. Diagn. Ind.* 1999, 48-52.
- Hokputsa, S., Jumel, K., Alexander, C., & Harding, S. A comparison of molecular mass determination of hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation equilibrium. *European Biophysics Journal*, 2003, 32(5), 450–456.
- Homma, A., Sato, H., Okamachi, A., Emura, T., Ishizawa, T., Kato, T., et al. Novel hyaluronic acid–methotrexate conjugates for osteoarthritis treatment. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, 17(13), 4647–4656.
- Homma, A., Sato, H., Tamura, T., Okamachi, A., Emura, T., Ishizawa, T., et al. Synthesis and optimization of hyaluronic acid–methotrexate conjugates to maximize benefit in the treatment of osteoarthritis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2010, 18(3), 1062–1075.
- <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>
- <https://www.varianinc.com/media/sci/apps/lc05.pdf>
- Hua, Q., Knudson, C., & Knudson, W. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science*, 1993, 106(1), 365–375.
- Huin-Amargier, C., Marchal, P., Payan, E., Netter, P., & Dellacherie, E. New physically and chemically crosslinked

- hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 76(2), 416–424.
- Hwang, S., Kim, D., Chung, S., & Shim, C. Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis. *Journal of controlled Release*, 2008, 129(2), 100–106.
 - Hyung, W., Ko, H., Park, J., Lim, E., Sung, B., Park, Y., et al. Novel hyaluronic acid (HA) coated drug carriers (HCDCs) for human breast cancer treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(2), 442–454.
 - Ibrahim, S., Kang, Q., & Ramamurthi, A. The impact of hyaluronic acid oligomer content on physical, mechanical, and biologic properties of divinyl sulfone-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 94(2), 355–370.
 - Irie T., Uekama K., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation, *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86 pp. 147-162.
 - Jeanloz, R., & Forchielli, E. Studies on hyaluronic acid and related substances. I. Preparation of hyaluronic acid and derivatives from human umbilical cord. *The Journal of biological chemistry*, 1950, 186(2), 495–511.
 - Jederstrom, G., Andersson, A., Gråsjö, J., & Sjöholm, I. Formulating insulin for oral administration: Preparation of hyaluronan–insulin complex. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21(11), 2040–2047.
 - Jedrzejewski, M. J., & Stern, R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins*, 2005, 61(2), 227–238.
 - Jeon, O., Song, S., Lee, K., Park, M., Lee, S., Hahn, S., et al. Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic

acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70(3), 251–257.

- Jeong, Y., Kim, S., Jin, S., Ryu, H., Jin, Y., Jung, T., et al. Cisplatin-incorporated hyaluronic acid nanoparticles based on ion-complex formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97(3), 1268–1276.
- Jia, X., Colombo, G., Padera, R., Langer, R., & Kohane, D. Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid. *Biomaterials*, 2004, 25(19), 4797–4804.
- Kablik, J., Monheit, G., Yu, L., Chang, G., & Gershkovich, J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery*, 2009, 35(SUPPL. 1), 302–312.
- Kafedjiiski, K., Jetti, R., Föger, F., Hoyer, H., Werle, M., Hoffer, M., et al. Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 343(1–2), 48–58.
- Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Stamenkovic I. “Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation” *Genes & Dev*, 1997, 11: 996-100.
- Kellomäki M, Niiranen H, Puumanen K, Ashammakhi N, Waris T, Törmälä P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomater*, 2000, 21:2495–505.
- Khademhosseini A, Suhb KY, Yangbc JM, Enga G, Yeha J, Levenberga S, et al. Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials*, (2004) 25: 35: 83-92.
- Kim, A., Checkla, D. M., Dehazya, P., & Chen, W. Characterization of DNA–hyaluronan matrix for sustained gene transfer. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2003, 90(1), 81–95.

- Kim, S. J., Hahn, S. K., Kim, M. J., Kim, D. H., & Lee, Y. P. Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles. *Journal of Controlled Release*, 2005, 104(2), 323–335.
- King, S., Hickerson, W., Proctor, K., & Newsome, A. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*, 1991, 109(1), 76–84.
- Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.*, 1986, 204(3):322-30.
- Kogan, G., Soltés, L., Stern, R., & Gemeiner, P. Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(1), 17–25.
- Kong, J., Oh, E., Chae, S., Lee, K., & Hahn, S. Long acting hyaluronate –Exendin 4 conjugate for the treatment of type 2 diabetes. *Biomaterials*, 2010, 31(14), 4121–4128.
- Kuo, J., Swann, D., & Prestwich, G. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry*, 1991, 2(4), 232–241.
- Kurisawa, M., Chung, J., Yang, Y., Gao, S., & Uyama, H. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid–tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chemical Communications*, 2005, 34, 4312–4314.
- Kyyronen, K., Hume, L., Benedetti, L., Urtti, A., Topp, E., & Stella, V. Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery: In vitro and in vivo release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 80(2–3), 161–169.
- Lai, J., Ma, D., Cheng, H., Sun, C., Huang, S., Li, Y., et al. Ocular biocompatibility of carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels for cell sheet delivery carriers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2010, 21(3), 359–376.

- Lampe KJ, Namba RM, Silverman TR, Bjugstad KB, Mahoney MJ. Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103:1214–23.
- Lapčák, L., Jr., Lapčák, L., De Smedt, S., Demeester, J., & Chabreček, P. Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, 98(8).
- Larsen, N., & Balazs, E. Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, 7(2), 279–293.
- Laurencin C, Lane JM. Poly (lactic acid) and Poly (glycolic acid): orthopaedic surgery applications. In: Bone formation and repair. Brighton C, Friedlaender G, Lane JM, Eds. Rosemont: Am Acad Orthop Surg, 1994, p 325-339.
- Laurent, T. The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. London: Portland Press, 1998.
- Laurent, T., & Fraser, J. Hyaluronan. *FASEB Journal*, 1992, 6(7), 2397–2404.
- Laurent, T., Hellsing, K., & Gelotte, B. Cross-linked gels of hyaluronic acid. *Acta Chemica Scandinavia*, 1964, 18(1), 274–275.
- Laurent, T., Laurent, U., & Fraser, J. Functions of hyaluronan. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1995, 54(5), 429–432.
- Lavery LA, Vela SA, Lavery DC, Quebedeaux TL. Reducing dynamic foot pressures in high-risk diabetic patients with foot ulcerations: a comparison of treatments. *Diabetes Care*, 1996, 19: 818-821.
- Leach, J., Bivens, K., Patrick, C., Jr., & Schmidt, C. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(5), 578–589.

- Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 2005, 26(2):125-35.
- Lee, H., Mok, H., Lee, S., Oh, Y., & Park, T. Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *Journal of Controlled Release*, 2007, 119(2), 245–252.
- Lee, J., & Spicer, A. Hyaluronan: A multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12(5), 581–586.
- Lemperle, G., Morhenn, V., & Charrier, U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2003, 27(5), 354–366.
- Leonelli, F., La Bella, A., Francescangeli, A., Joedioux, R., Capodilupo, A., Quagliariello, M., et al. A new and simply available class of hydrosoluble bioconjugates by coupling paclitaxel to hyaluronic acid through a 4-hydroxybutanoic acid derived linker. *Helvetica Chimica Acta*, 2005, 88(1), 154–159.
- Lepidi S, Abatangelo G, Vindigni V, Deriu GP, Zavan B, Tonello C, Cortivo R. In vivo regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold. *FASEB J.*, 2006, Jan;20(1):103-5.
- Lesley J, Hyman R, Ishihara K, Kincade PW. “Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition.” *J Cell Biol.*, 1992, 119 (6): 1711-9.
- Lin, Y., Matsumoto, Y., Kuroyanagi, Y., & Kagawa, S. A bilayer hyaluronic acid wound dressing to promote wound healing in diabetic ulcer. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2009, 24(5), 424–443.
- Lina B.A.R., B □ r A., Subchronic oral toxicity studies with α -cyclodextrin in rats, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2004, 39 S14-S26.

- Lorenz W. Walter Lorenz Surgical Inc. Available at: www.lorenzsurgical.com. Accessed: April 2010.
- Luo, Y., Kirker, K., & Prestwich, G. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2000, 69(1), 169–184.
- Luo, Y., & Prestwich, G. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, 10(5), 755–763.
- Luo, Y., Ziebell, M., & Prestwich, G. A hyaluronic acid – Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules*, 2000, 1(2), 208–218.
- Lurie, Z., Offer, T., Russo, A., Samuni, A., & Nitzan, D. Do stable nitroxide radicals catalyze or inhibit the degradation of hyaluronic acid? *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, 35(2), 169–178.
- Magnani, A., Rappuoli, R., Lamponi, S., & Barbucci, R. Novel polysaccharide hydrogels: Characterization and properties. *Polymers for Advanced Technologies*, 2000, 11(8–12), 488–495.
- Mainil-Varlet P. Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36:360–80.
- Maleki, A., Kjøniksen, A., & Nyström, B. Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents. *Carbohydrate Research*, 2007, 342(18), 2776–2792.
- Maleki, A., Kjøniksen, A., & Nyström, B. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular Symposia*, 2008, 274(1), 131–140.
- Malson, T., & Lindqvist, B. Gels of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substitute. 1986, WO1986000079.
- Marecak, D. Hyaluronic acid–protein conjugates, pharmaceutical compositions and related methods. 2001, WO 01/05434.

- Marhaba R., Zoller M. “CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation.” *J Mol Histol.*, 2004, 35 (3) pp. 211-31.
- Mendichi, R., Schieron, A., Grassi, C., & Re, A. Characterization of ultra-high molar mass hyaluronan. 1. Off-line static methods. *Polymer*, 1998, 39(25), 6611–6620.
- Milella E, Brescia E, Massaro C, Ramires PA, Miglietta MR, Fiori V, Aversa P. Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzil esters as tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 2002, 23: 1053-1063.
- Misra S Ghatak S, Zoltan-Jones A, and B. P. Toole. “Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Cells by Hyaluronan”. *J. Biol. Chem.*, July 3, 2003, 278(28): 25285 – 25288.
- Mlc̣ochová, P., Bystrický, S., Steiner, B., Machová, E., Koós, M., Velebný, V., et al. Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives. *Biopolymers*, 2006, 82(1), 74–79.
- Morra, M. Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. *Biomacromolecules*, 2005, 6(3), 1205–1223.
- Morra M, Cassinelli C. Wettability and surface structure of hyaluronic acid and hyaluronic acid ester fouling-resistant coatings. In: *ACS polymeric materials science and engineering*. San Francisco, CA: ACS, (1997): p 566-567.
- Mustoe TA, Culter NR, Allman RM, Goode PS, Deuel TF, Prause JA, Bear M, Serdar CM and Pierce GF. A phase II study to evaluate recombinant platelet-derived growth factor-BB in the treatment of stage 3 and 4 pressure ulcers. *Arch. Surg.*, 1994, 129: 213-219.
- Na, S., Chae, S., Lee, S., Park, K., Kim, K., Park, J., et al. Stability and bioactivity of nanocomplex of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 363(1–2), 149–154.

- Nagano O., Saya H. “Mechanism and biological significance of CD44 cleavage.” *Cancer Sci.*, 2004, 95 (12) pp. 930-5.
- Nakajima, N., & Ikada, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chemistry*, 1995, 6(1), 123–130.
- Naor D., Sionov R.V., Ish-Shalom D. “CD44: structure, function, and association with malignant process.” *Adv Cancer Res.*, 1997, 71 pp. 241-319.
- Narins, R., Brandt, F., Leyden, J., Lorenc, Z., Rubin, M., & Smith, S. A randomized, double-blind, multicenter comparison of the efficacy and tolerability of restylane versus zyplast for the correction of nasolabial folds. *Dermatologic Surgery*, 2003, 29(6), 588–595.
- Nishi, C., Nakajima, N., & Ikada, Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995, 29(7), 829–834.
- Oerther, S., Maurin, A., Payan, E., Hubert, P., Lapique, F., Presle, N., et al. High interaction alginate–hyaluronate associations by hyaluronate deacetylation for the preparation of efficient biomaterials. *Biopolymers*, 2000, 54(4), 273–281.
- Oh, E., Park, K., Kim, K., Kim, J., Yang, J., Kong, J., et al. Target specific and longacting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*, 2010, 141(1), 2–12.
- Palumbo F S, Pitarresi G, Mandracchia D, Tripodo G, Giammona G. New Graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Syntesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 66: 379-385.
- Panyam EJ and Labhasetwar V. Biodegradable nano-particles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2003, 55: 329–347.

- Papenburg BJ, Liu J, Higuera G, Barradas AMC, Boer J, Blitterswijk VCA, et al. Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering. *Biomater*, 2009, 30:6228–39.
- Park K, Shalaby WSW, Park H (eds.). *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, Technomic Publishing Co., 1993, Inc., Lancaster.
- Partsch G, Schwarzer CH, Neumiiller J, Dunky A, Petera P, Brbl H, Ittner G, Jantsch S. Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid, *Zeitschrift fur Rheumatologie*, 1989, 48: 123-128.
- Pavesio A, Abatangelo G, Borriore A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *ovartis Found Symp.*, 2003, 249:203-17; discussion 229-33, 234-8, 239-41. Review.
- Pavesio A, Renier D, Cassinelli C, Morra M. Anti-adhesive surfaces through hyaluronan coatings. *Med Device Technol*, (1997) 8: 20–1, 24–7.
- Peer, D., &Margalit, R. Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models. *Neoplasia*, 2004a, 6(4), 343–353.
- Peer, D., &Margalit, R. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models. *International Journal of Cancer*, 2004b, 108(5), 780–789.
- Pelletier, S., Hubert, P., Lapique, F., Payan, E., & Dellacherie, E. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: Synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 43(4), 343–349.
- Peris-Marti JF, Borrás-Blasco J, Rosique-Robles JD, Gonzalez-Delgado M. Evaluation of once daily tobramycin dosing in

critically ill patients through Bayesian simulation. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (2004) 29: 65–70.

- Piacquadio, D., Jarcho, M., & Goltz, R. Evaluation of hylan b gel as a soft-tissue augmentation implant material. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1997, 36(4), 544–549.
- Piron, E., & Tholin, R. (2002). WO2002006350.
- Pitarresi G, Palumbo FS, Albanese A, Calabrese R, Giammona G. Synthesis of novel graft copolymers of hyaluronan, polyethyleneglycol and polylactic acid. *Macromolecules An Indian Journal*, 2007, 2: 53-56.
- Pitt C. Poly-_-coprolactone and its copolymers. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (M. Chasin, R. Langer, eds.), 1990, pp. 71-120, Marcel Dekker, New York.
- Pitt, W., Morris, R., Mason, M., Hall, M., Luo, Y., & Prestwich, G. Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, 68(1), 95–106.
- Platt, V., & Szoka, F., Jr. Anticancer therapeutics: Targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5(4), 474–486.
- Pouyani, T., Harbison, G., & Prestwich, G. Novel hydrogels of hyaluronic acid: Synthesis, surface morphology, and solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(17), 7515–7522.
- Pouyani, T., & Prestwich, G. Functionalized derivatives of hyaluronic acid oligosaccharides: Drug carriers and novel biomaterials. *Bioconjugate Chemistry*, 1994, 5(4), 339–347.
- Prata, J., Barth, T., Bencherif, S., & Washburn, N. Complex fluids based on methacrylated hyaluronic acid. *Biomacromolecules*, 2010, 11(3), 769–775.
- Pravata, L., Braud, C., Boustta, M., El Ghzaoui, A., Tømmeraas, K., Guillaumie, F., et al. New amphiphilic lactic acid oligomer–

hyaluronan conjugates: Synthesis and physicochemical characterization. *Biomacromolecules*, 2008, 9(1), 340–348.

- Prestwich, G., Marecak, D., Marecek, J., Vercruysse, K., & Ziebell, M. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: Synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, 1998, 53(1–3), 93–103.
- Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50(2):101-9.
- Ramamurthi, A, & Vesely, I. Smooth muscle cell adhesion on crosslinked hyaluronan gels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 60(1), 196–205.
- Rangaswamy, V., & Jain, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(3), 493–496.
- Rao V.M., Stella V.J., When can cyclodextrins be considered for solubilizing purposes? *J. Pharm. Sci.*, 2003, 92 pp. 927-932.
- Rastelli A, Beccaro M, Biviano F, Calderini G, Pastorello A. Hyaluronic acid esters, a new class of semisynthetic biopolymers: chemical and physico-chemical properties, *Clinical Implant Materials-Advances in Biomaterials*, 1990. Vol. 9 (g. Heimke, U. Soltesz, A.J.C. Lee, eds.), pp. 199-206, Elsevier, Amsterdam.
- Richert, L., Boulmedais, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., et al. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules*, 2004, 5(2), 284–294.
- Rivkin, I., Cohen, K., Koffler, J., Melikhov, D., Peer, D., & Margalit, R. Paclitaxel clusters coated with hyaluronan as selective tumor-targeted nanovectors. *Biomaterials*, 2010, 31(27), 7106–7114.

- Robert, L., Robert, A., & Renard, G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie*, 2010, 58(3), 187–198.
- Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Altrock BW, Pence PC, Heggers JP, Johnston AF, McHugh TP, Antohony MS, Robson LE, Odom LL, Yanagihara D and Pierce GF. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers, *Ann. Plast. Surg.*, 1992, 29: 193-201.
- Rosato, A., Banzato, A., De Luca, G., Renier, D., Bettella, F., Pagano, C., et al. HYTAD1-p20: A new paclitaxel-hyaluronic acid hydrosoluble bioconjugate for treatment of superficial bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2006, 24(3), 207–215.
- Saettone, M., Giannaccini, B., Chetoni, P., Torracca, M., &Monti, D. Evaluation of high- and low-molecular-weight fractions of sodium hyaluronate and an ionic complex as adjuvants for topical ophthalmic vehicles containing pilocarpine. *International Journal of Pharmaceutics*, 1991, 72(2), 131–139.
- Sahoo, S., Chung, C., Khetan, S., & Burdick, J. Hydrolytically degradable hyaluronic acid hydrogels with controlled temporal structures. *Biomacromolecules*, 2008, 9(4), 1088–1092.
- Sall, I., &Férard, G. Comparison of the sensitivity of 11 crosslinked hyaluronic acid gels to bovine testis hyaluronidase. *Polymer Degradation and Stability*, 2007, 92(5), 915–919.
- Schneider, A., Picart, C., Senger, B., Schaaf, P., Voegel, J., & Frisch, B. Layer-by-layer films from hyaluronan and amine-modified hyaluronan. *Langmuir*, 2007, 23(5), 2655–2662.
- Seidlits, S., Khaing, Z., Petersen, R., Nickels, J., Vanscoy, J., Shear, J., et al. The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation. *Biomaterials*, 2010, 31(14), 3930–3940.

- Serban, M., Yang, G., & Prestwich, G. Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative. *Biomaterials*, 2008, 29(10), 1388–1399.
- Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R., et al. Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules*, 2004, 5(6), 2122–2127.
- Shu, X., Liu, Y., Luo, Y., Roberts, M., & Prestwich, G. Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules*, 2002, 3(6), 1304–1311.
- Shula Radin, Paul Ducheyne. Controlled release of vancomycin from thin sol–gel films on titanium alloy fracture plate material. *Biomaterials* 28 (2007) 1721–1729
- Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *The New England J Med*, 1999, 341(10): 738-46.
- Smeds, K. A., & Grinstaff, M. W. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 54(1), 115–121.
- Speller DCE. Hospital-associated infections. In: Parker MT, Collier LH, Smith GR, Easman CSF, Eds. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, (1990) Vol. 3: 142-167.
- Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds, *The American J Surg*, 1998, 176(2A Suppl): 26S-38S, Review.
- Steed DL, Donohoe D, Webster MW, Lindsley L. Effect of extensive debridement and treatment on the healing of diabetic foot ulcers, *J Am Coll Surg.*, 1996, 183: 61- 64.
- Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcer. *J. Vasc. Surg.*, 1995, 21: 71-78.

- Stella V., Rao V., Zannou E., Zia V., Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, 36 pp. 3-16.
- Stern, R. Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 2008, 18(4), 275–280.
- Stern, R., Asari, A., & Sugahara, K. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 2006, 85(8), 699–715.
- Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M., & Soltés, L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(6), 537–557.
- Steve WN, Ueng, Li-Jen Yuan, Ning Lee, Song-Shu Lin, Shih-Jung Liu, Err-Cheng Chan, Jui-Hsun Weng. In vivo study of hot compressing molded 50:50 poly (DL-lactide-co-glycolide) antibiotic beads in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, (2002) 20: 654-661.
- Strickley R.G., 2004
- Sugahara, K., Hirata, T., Hayasaka, H., Stern, R., Murai, T., & Miyasaka, M. Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(9), 5861–5868.
- Taetz, S., Bochot, A., Surace, C., Arpicco, S., Renoir, J., Schaefer, U. F., et al. Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells. *Oligonucleotides*, 2009, 19(2), 103–116.
- Tan ML, Choong PF, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*, 2010, 31:184–93.
- Thies J and Müller BW. Size controlled production of biodegradable microparticles with supercritical gases, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998, 45: 67–74.

- Thompson D.O., Cyclodextrins-enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, 1997, 14 pp. 1-104.
- Toemmeraas, K., & Eenschooten, C. Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives. 2007, WO/2007/033677.
- Tokita, Y., Ohshima, K., & Okamoto, A. Degradation of hyaluronic acid during freeze drying. *Polymer Degradation and Stability*, 1997, 55(2), 159–164.
- Tomihata, K., & Ikada, Y. Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*, 1997a, 18(3), 189–195.
- Tomihata, K., & Ikada, Y. Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1997b, 35(16), 3553–3559.
- Tonello C, Vindigni V, Zavan B, Abatangelo S, Abatangelo G, Brun P, Cortivo R. In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds. *FASEB J.*, 2005, 19(11):1546-8.
- Turley E.A, Belch A.J, Poppema S., Pilarski L.M. “Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes.” *Blood.*, 1993, 81 (2) pp. 446-53.
- Tzircotis G, Thorne RF, Isacke CM. “Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding.” *J Cell Sci.*, 2005, 118 (21): 5119-28.
- Uekama K. (Ed.), *Cyclodextrins in drug delivery*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, vol. 36.

- Uekama K., Hirayama F., Arima H., Recent aspects of cyclodextrin based drug delivery systems, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2006, 56 pp. 3-8.
- Vercruysse, K., Prestwich, G., & Kuo, J. Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1998, 15(5), 513–555.
- Verheye, S., Markou, C., Salame, M., Wan, B., King, S., III, Robinson, K., et al. Reduced thrombus formation by hyaluronic acid coating of endovascular devices. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, 20(4), 1168–1172.
- Von Recum HA, Cleek RL, Eskin SG, Mikos AG. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials*, 1995, 16(6):441-7.
- Weiss JM, Renkl AC, Ahrens T, Moll J, Mai BH, Denfeld RW, Schopf E, Ponta H, Herrlich P, Simon JC. „Activation-dependent modulation of hyaluronate-receptor expression and of hyaluronateavidity by human monocytes”. *J Invest Dermatol.*, 1998, 111: 227-232.
- Weng, L., Gouldstone, A., Wu, Y., & Chen, W. Mechanically strong double network photocrosslinked hydrogels from N,N-dimethylacrylamide and glycidyl methacrylated hyaluronan. *Biomaterials*, 2008, 29(14), 2153–2163.
- Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (beclapernin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers: a phase III randomized placebo controlled double-blind study. *Diabetes Care*, 1998, 21: 822-827.
- Winkler R.G., Fioravanti S., Ciccotti G., Margheritis C., Villa M., Hydration of β -cyclodextrin: a molecular dynamics simulation study, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2000, 14 pp. 659-667.
- Xin, D., Wang, Y., & Xiang, J. The use of amino acid linkers in the conjugation of paclitaxel with hyaluronic acid as drug delivery

system: Synthesis, self-assembled property, drug release, and in vitro efficiency. *Pharmaceutical Research*, 2010, 27(2), 380–389.

- Yadav, A. K., Mishra, P., Mishra, A. K., Mishra, P., Jain, S., & Agrawal, G. P. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 3(4), 246–257.
- Yamane H, Sasai K. Effect of the addition of poly(D-lactic acid) on the thermal property of poly(L-lactic acid). *Polymer*, 2003, 44:2569–75.
- Yang, J., Yamato, M., Nishida, K., Ohki, T., Kanzaki, M., Sekine, H., et al. Cell delivery in regenerative medicine: The cell sheet engineering approach. *Journal of Controlled Release*, 2006, 116(2), 193–203. Yeom et al., 2010
- Yeom, J., Bhang, S., Kim, B., Seo, M., Hwang, E., Cho, I., et al. Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, 21(2), 240–247.
- Yerushalmi, N., Arad, A., & Margalit, R. Molecular and cellular studies of hyaluronic acid-modified liposomes as bioadhesive carriers for topical drug delivery in wound healing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 313(2), 267–273.
- Yoo H S, Park TG. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of Controlled Release*, (2004) 96: 273–283.
- Young, J., Cheng, K., Tsou, T., Liu, H., & Wang, H. Preparation of crosslinked hyaluronic acid film using 2-chloro-1-methylpyridinium iodide or water-soluble 1-ethyl-(3,3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2004, 15(6), 767–780.
- Yui, N., Okano, T., & Sakurai, Y. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *Journal of Controlled Release*, 1992, 22(2), 105–116.

- Yun, Y., Goetz, D., Yellen, P., & Chen, W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials*, 2004, 25(1), 147–157.
- Zeng C, Toole BP, Kinney SD, Kuo JW, Stamenkovic I."Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers." *Int J Cancer.*, 1998, 77 (3): 396-401.
- Zhang, L., Underhill, C., & Chen, L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Research*, 1995, 55(2), 428–433.
- Zhao, X. Process for the production of multiple cross-linked hyaluronic acid derivatives, 2000, WO/2000/046253.
- Zhao, X. Synthesis and characterization of a novel hyaluronic acid hydrogel, *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 2006, 17(4), 419–433.